

Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Darponen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

von
Christian Prühs
aus Hamburg

1. Referent:	Prof. Dr. C. Kunick
2. Referent:	Prof. Dr. H. Wätzig
eingereicht am:	01.11.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09.01.2007
Druckjahr:	2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus der Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch Prof. Dr. C. Kunick, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Kunick, C.: Novel molecular targets in cancer chemotherapy waiting for discovery. Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents, 2004, 4, 421-423.

Kunick, C., Bleeker, C., Prühs, C., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G. und Link, A.: Matrix compare analysis discriminates subtle structural differences in a family of novel antiproliferative agents, diaryl-3-hydroxy-2,3,3a,10a-tetrahydrobenzo[b]cyclopenta[e]azepine-4,10(1*H*,5*H*)-diones. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 2148-2153.

Tagungsbeiträge

Prühs, C. und Kunick, C.: Synthesis of darpones with aminoalkyl side chains. (Poster) DPhG-Jahrestagung und Joint Meeting, Regensburg, 07.-09.10. 2004

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2002 bis Dezember 2003 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg und in der Zeit von Januar 2004 bis Oktober 2006 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig unter der Anregung und Anleitung von

Herrn Prof. Dr. C. Kunick,

dem ich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, die vielen wissenschaftlichen Gespräche und für die Zeit in seinem Arbeitskreis herzlich danke.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Prof. Dr. H. Wätzig

für die Übernahme des Koreferats und der

Deutschen Forschungs Gemeinschaft

für die Förderung des Projektes Ku 1371/1-1 und 1371/1-2

Meinen Eltern gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AdoHcy	S-Adenosyl-L-Homocystein
ADP	Adenosindiphosphat
ADS	Antitumor Drug Screening
aliph.	aliphatisch
Äq.	Äquivalente
arom.	aromatisch
ATP	Adenosintriphosphat
b	vorliegendes Signal erscheint verbreitert
ber.	berechnet
bidest.	bidestilliert
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CNBr	Cyanbromid
δ	chemische Verschiebung
Δ	Differenz
ΔT	Zum Rückfluss erhitzen
d	Dublett
DAD	Dioden Array Detector
Darpon	2,4-Diaryl-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(7 <i>H</i>)-on
dem.	demineralisiert
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EATC	Ehrlichs Ascites Tumor Cells
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EF3A	Elongationsfaktor 3A
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alii
(Et ₃ NH) ₂ SO ₄	Triethylammoniumsulfat
FAB	Fast Atom Bombardement
FBP	Fare Upstream Element Binding Proteine
FUSE	Fare Upstream Element
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
gef.	gefunden
ggf.	gegebenenfalls
GHKL	DNA Gyrase subunit, HSP90, Histidin Kinase, MutL
GI ₅₀	Growth Inhibition Concentration for 50 %
GSH	Gluthathion
GSK-3	Glycogen-Synthase-Kinase-3
GTPase	Guanosintriphosphat Hydrolase
h	Stunde
HDH V	Humane DNA Helicase V
HEK-293	human embryonic kidney cell line 293
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HG	human gamete cells
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometrie
HSP90	Heat-Shock-Protein 90 β
Hz	Hertz

IVCLSP	In Vitro Cell Line Screening Project
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
kDa	Kilo Dalton
konz.	konzentriert
KPhth	Phthalimid-Kalium
LC ₅₀	Lethal Concentration for 50 %
Lit.	Literatur
log ₁₀	dekadischer Logarithmus
M	molar
m	Multipllett
m/z	Masse pro Ladung
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie
mAU	milli Absorption Unit
MDH	Malatdehydrogenase
Me	Methyl
MG-MID	Meangraph-Midpoint
MHz	Megahertz
min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
Mr	Molekularmasse
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NCI	National Cancer Institute
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NSC	Fortlaufende Nummerierung der Testsubstanzen am NCI
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PCC	Pearson correlation coefficient
PENDANT	Polarisation Enhancement During Attached Nucleus Testing
PFK-1	Phosphofructokinase-1

PGC	Pepsinogen C
Ph	Phenyl
P _i	Phosphat
PP	Proteinphosphatasen
PPA	Poly Phosphoric Acid
ppm	parts per million
proz.	prozentig
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase
Q	Quartett
Q-TOF-MS/MS	Quadrupol Time of Flight gekoppelte Massenspektrometrie
quart.	quartär
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s.	siehe
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	secundär
sog.	so genannte
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TATA	DNA-Basenabfolge: Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TBP	TATA-binding protein
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl
<i>tert</i>	tertiär
tert.	tertiär (Spektren)
TFA	Triflouressigsäure
TGF- α	Transforming Growth Factor α
TGI	Total Growth Inhibition
THF	Tetrahydrofuran

TIP120A	TATA-binding protein-interactin protein 120 A
TK	Transketolase
t_m	Totzeit
TReP-132	Transcriptional Regulating Protein 132
Trizma	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
t_s	Nettoretentionszeit
u. a.	unter anderem
UV	Ultra Violett
vergl.	vergleiche
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Fehler! Es wurden keine Einträge für das Inhaltsverzeichnis gefunden.

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	2,4-Diaryl-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(7 <i>H</i>)-one (Darpone)	1
1.2	Ungeklärter Wirkmechanismus der Darpone	5
1.3	Aufgabenstellung	8
2	Ermittlung einer Darponleitstruktur	10
2.1	Erzeugung eines Selektivitätsprofils im NCI-ADS	10
2.2	COMPARE-Analysen	13
2.3	Matrix-COMPARE-Analyse der Darponbibliothek	16
3	Synthesen	25
3.1	Methoden zur Darstellung von 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -[1]benzazepin-2,5-dionen	25
3.1.1	Oxidationsversuche mit 1,3,4,5-Tetrahydro-2 <i>H</i> -[1]benzazepin-2-onen	31
3.1.2	Alternative Synthese von 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -[1]benzazepin-2,5-dionen	35
3.2	Synthese von (2 <i>E</i>)-Diphenyl-prop-2-en-1-onen	42
3.3	Synthese von Darponderivaten zur Anknüpfung von Seitenketten	44
3.3.1	Synthese von Hydroxydarponen	44
3.3.2	Synthese des 10-Iod-2-(3-chlorphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6-ons	51
3.4	Synthese von Aminobutoxydarponen	54
3.4.1	Darstellung von Darponen mit primären Aminogruppen	54
3.4.2	Synthese von Darponen mit tertiären Aminogruppen	64
3.5	Synthese von Darponen mit Polyoxyethylenseitenketten	66
3.6	Anknüpfung von Seitenketten an 1-Naphthol	72
3.7	Palladium-katalysierte Reaktionen am Iod-Darpon	74
3.8	Versuche zur Oxidation des 3-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-10-yl]prop-2-in-1-ols	80

4	Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen	83
4.1	Ziel und Prinzip der Untersuchungen	83
4.2	Affinitätsuntersuchungen	85
4.2.1	Affinitätschromatographie	85
4.2.2	Trägermaterialien	85
4.2.3	Liganden	86
4.2.4	Immobilisierung	86
4.3	Proteinidentifizierung	88
4.3.1	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	88
4.3.2	Auswertung der Protein-Pherogramme	90
4.3.3	Proteinidentifikation mit Hilfe der Mikrosequenzierung	91
4.4	Affinitätsuntersuchungen mit Darponen	93
4.4.1	Auswahl eines geeigneten Trägermaterials	93
4.4.2	Kupplungsreaktion	93
4.4.3	Inkubation mit Zell- und Gewebeextrakten	101
4.4.3.1	Inkubation mit Seesternooocytenextrakt	101
4.4.3.2	Inkubation und Untersuchungen mit Schweinehirnextrakt	103
4.4.3.3	Inkubation mit Hefezelleextrakt	113
4.4.3.4	Inkubation mit Humanzelleextrakten	114
4.4.3.5	Inkubation mit Tumorzelleextrakten	118
5	Biologische Aktivität von Darponen	120
5.1	Biologische Aktivität und Struktur-Wirkungsbeziehung von funktionalisierten Darponen	120
5.2	Ergebnisse der Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen	129
5.2.1	Chaperone	131
5.2.1.1	Heat-Shock-Protein 90 β	131
5.2.1.2	Importin β	135
5.2.2	Isolierte Enzyme des Energie-Stoffwechsels	136
5.2.2.1	Phosphofructokinase-1	138
5.2.2.2	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	139

5.2.2.3	Enolase-1	139
5.2.2.4	Transketolase	140
5.2.2.5	ATP Synthase β -Untereinheit	140
5.2.2.6	3,2-Trans-Enoyl-CoA Isomerase	141
5.2.3	Transkriptionsproteine	142
5.2.3.1	FUSE Binding Protein 1 und 2	142
5.2.3.2	TBP-interactin protein 120 A	143
5.2.3.3	Transcriptional Regulating Protein 132	143
5.2.3.4	Elongationsfaktor 3A	143
5.2.4	Enzyme des Aminosäurestoffwechsels	145
5.2.4.1	Ketosäuren-Reduktoisomerase	145
5.2.4.2	Glutaminase	145
5.2.4.3	Alanyl-tRNA-Synthetase	146
5.2.5	Peptidasen	147
5.2.5.1	Puromycin-sensitive Aminopeptidase	147
5.2.5.2	Pepsinogen C	148
5.2.6	Weitere Enzyme ohne gemeinsame Klassenzugehörigkeit	149
5.2.6.	Squalensynthase	149
5.2.6.2	S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase	149
5.2.6.3	65 kDa Untereinheit A der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A	150
5.3	Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	151
6	Zusammenfassung	153
	Summary	155
7	Experimenteller Teil	157
7.1	Versuche zu Kapitel 3	157
7.1.1	Allgemeines	157
7.1.2	Synthesen und Analytische Daten	161
7.2	Versuche zu Kapitel 4	242
7.2.1	Allgemeines	242
7.2.1.1	Verwendete Geräte	242

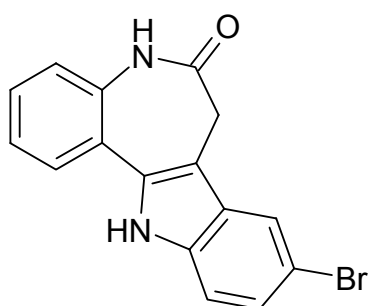
7.2.1.2	Materialien	243
7.2.1.3	Lösungen	244
7.2.1.4	Biologisches Material	246
7.2.2	Methoden	247
8	Anhang	252
8.1	Daten der COMPARE-Analyse aus Kapitel 2	252
8.2	Daten der Löslichkeitsuntersuchungen	257
8.3	Gefahrstoffverzeichnis	258
8.4	Literaturverzeichnis	265
	Danksagung	277

1 Einleitung und Problemstellung

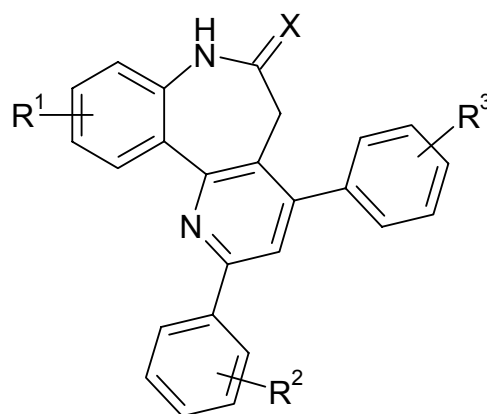
1.1 2,4-Diaryl-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6(7H)-one (Darpone)

Für viele Verbindungsklassen, die auf der heterocyclischen Grundstruktur von [1]Benzazepinonen basieren, sind in den vergangenen Jahren antiproliferative Effekte bei kultivierten Tumorzellen und Tumoren in Tiermodellen beschrieben worden.^{1, 2} Zu diesen Verbindungstypen zählen einfache Benzazepin-2,5-dione,³ spiroanellierte [1]Benzazepin-2,5-dione⁴ und naphthanellierte [1]Benzazepinone.⁵ Die bekannteste Gruppe antiproliferativer Benzazepinone stellen die Paullone dar, eine von Kunick et al. entwickelte Familie von Indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(7H)onen, die durch die Leitstruktur Kenpaullon (**1a**) repräsentiert werden.^{6, 7} Auch die mit den Paullonen strukturverwandten Darpone (= 2,4-Diaryl-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6(7H)-one, allgemeine Struktur **2**) wurden erstmals in Arbeitskreis Kunick synthetisiert.⁸ Darpone zeigen im *in vitro* Antitumor Drug Screening (ADS) des National Cancer Institutes (NCI) ausgeprägte antiproliferative Aktivität mit Selektivität für bestimmte Zelllinien. Zur Beschreibung qualitativer Strukturwirkungsbeziehungen wurde die allgemeine Darpon-Struktur **2** umfassend modifiziert.⁹

Abb. 1-1: Kenpaullon **1a** und allgemeine Struktur der Darpone **2**



1a

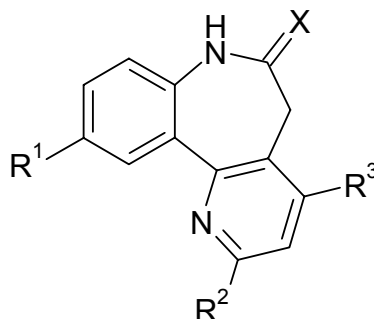


2

Es zeigte sich, dass sekundäre Lactame und die analogen Thiolactame etwa gleich starke antiproliferative Aktivität aufweisen. Durch Alkylierung des Lactam-Stickstoffs oder Substitution der Lactamfunktion durch andere Gruppen gehen wachstumshemmende Aktivität und Selektivität deutlich zurück. Dagegen können die Phenylsubstituenten und der Benzoanelland substituiert oder durch andere heteroaromatische Systeme ausgetauscht werden, ohne dass die antiproliferative Aktivität verschwindet.^{9, 10} Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Arylsubstituenten in 2- und in 4-Position Bestandteil des Pharmakophors sind.¹¹

Darüber hinaus wurden zehn Vertreter (**2A-E** und **2a-e**) aus der Reihe der Darpone mit besonders hoher wachstumshemmender Aktivität bzw. besonders ausgeprägter Selektivität für *in vivo*-Untersuchungen beim NCI ausgewählt, die in Form von Hohlfasertests¹² durchgeführt wurden.¹³ Aus den in Tabelle 1-1 aufgeführten Punktwertungen ergibt sich, dass sechs der getesteten Substanzen die Kriterien für eine weitere Entwicklung erfüllen. Voraussetzung dafür sind 20 Gesamtpunkte oder 8 Punkte aus subkutaner Applikation oder eine totale Wachstumshemmung bei den implantierten Tumoren. Bei vier dieser sechs Verbindungen wurden zwei Kriterien erreicht, während **2E** sogar alle drei Kriterien erfüllte.

Tab. 1-1 : Ergebnisse der Hohlfaser-Untersuchungen mit den 2,4-Diaryl-5*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6(7*H*)-onen **2A-E** und –thionen **2a-e**



Nr.	X	R ¹	R ²	R ³	IP	SC	Punkte Gesamt	GI Total	Erfüllte Kriterien
2A	O	H	4-Cl-Ph	Ph	12	0	12	-	0
2B	O	H	3-Cl-Ph	Ph	2	8	10	+	++
2C	O	H	Ph	4-Cl-Ph	2	6	8	-	0
2D	O	Br	Ph	Ph	8	4	14	-	0
2E	O	H	Ph	3,4-Di-MeOPh	12	8	20	+	+++
2a	S	H	Ph	Ph	2	4	6	-	0
2b	S	H	4-Cl-Ph	Ph	14	6	20	-	+
2c	S	H	3-Cl-Ph	Ph	14	8	22	-	++
2d	S	H	2-Naphthyl	4-Cl-Ph	8	10	18	+	++
2e	S	H	Ph	2-Thienyl	12	8	20	-	++

Detaillierte Beschreibung des Testverfahrens siehe Literatur.¹² IP = Punktezahl aus der intraperitonealen Applikation. SC = Punktezahl aus der subkutanen Applikation. GI = Wachstumshemmung. Ergebnisse, die den Kriterien für die weiterführende Bearbeitung der Substanz entsprechen, sind fett gedruckt: 20 Gesamtpunkte oder 8 Punkte aus SC oder totale GI bei den implantierten Tumoren.

Berücksichtigt man, dass bei den Experimenten Zelllinien verwendet werden, die sich *in vitro* als eher unempfindlich gegen die Vertreter der hier untersuchten Verbindungen erwiesen hatten, so ergibt sich hieraus ein weiterer positiver Aspekt. Hinzu kommt die Tatsache, dass trotz der hohen Dosen der eingesetzten Verbindungen (400 mg/kg) keine toxischen Effekte bei den behandelten Tieren auftraten. Diese Resultate der Hohlfaser-Testungen sind viel versprechend für weiterführende pharmakologische Untersuchungen. Allerdings ist die Testung der Darpone in Xenograft-Modellen und in pharmakokinetischen Studien durch deren geringe Löslichkeit in gängigen, für die Applikation im Tierversuch verwendbaren Lösungsmitteln, einschränkt.

Für die weitere rationale Entwicklung der Darpone ist die Aufklärung des Mechanismus der antiproliferativen Aktivität für Tumorzellen unabdingbar. Erst wenn die intrazelluläre Zielstruktur identifiziert ist, können Untersuchungen an dem entsprechenden isolierten Biomolekül durchgeführt werden, um die Bioaktivität der Darpone weiter zu steigern. Auch die Einschätzung bezüglich des Entwicklungspotentials der Darpone als Antitumortheraeutika kann erst nach Klärung des Wirkmechanismus erfolgen. Von Interesse wären die Darpone insbesondere dann, wenn es sich um ein neues, bisher nicht für andere Verbindungen beschriebenes Wirkprinzip handelte.

1.2 Ungeklärter Wirkmechanismus der Darpone

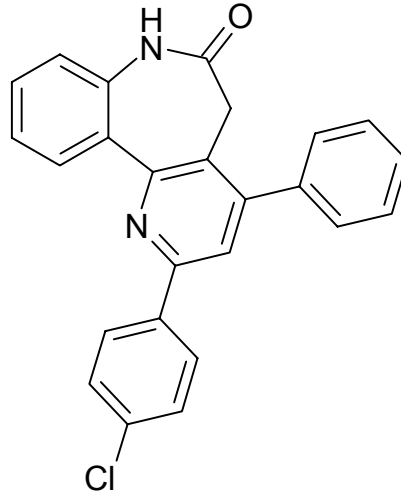
Aus der chemischen Struktur der Darpone sind Wirkmechanismen von bereits etablierten Antitumortheraeutika (alkylierende Eigenschaften, Tubulin-Bindung, Interkalation etc.) auf den ersten Blick nicht ableitbar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Darpone zu den Paullonen schien ein gemeinsamer Wirkmechanismus der Verbindungen nahe liegend zu sein. Die antiproliferative Aktivität der Paullone wird auf die Hemmung Cyclin-abhängiger Kinasen zurückgeführt. Das Darpon **2e** zeigte jedoch bei einer Untersuchung an einem CDK1/Cyclin-B-Komplex nur schwache Hemmaktivität ($IC_{50} = 33 \mu M$).¹⁴ Das durch eine antiproliferative Verbindung im NCI-Antitumorscreening erzeugte Selektivitätsmuster läßt häufig einen Rückschluss auf ihren Wirkmechanismus zu.¹⁵⁻¹⁸ Die Selektivitätsmuster der Paullone und der Darpone im NCI-Antitumorscreening unterscheidet sich jedoch gravierend, was gegen einen gemeinsamen Mechanismus spricht.

Um zu einer Arbeitshypothese über den Wirkmechanismus der Darpone zu gelangen, wurden die GI_{50} -Selektivitätsmuster von sieben Darponen als Startprofil für eine COMPARE-Analyse¹⁵ in der über das Internet frei zugänglichen NCI-Datenbank verwendet, die zu dem damaligen Zeitpunkt die Testergebnisse von etwa 30000 im ADS untersuchten Verbindungen enthielt. Als Ergebnisse wurden jeweils Auflistungen der 50 im Selektivitätsmuster ähnlichsten Verbindungen erzeugt. Die Auswertung der Ranglisten ergab, dass sich unter den gelisteten Vertretern mit Korrelationskoeffizienten über 0.6 weder etablierte Antitumorwirkstoffe noch sehr potente Verbindungen befanden. Eine weitere COMPARE-Analyse mit **2e** als Startprofil wurde in der NCI-Datenbank der 171 "Standard Antitumor Agents" durchgeführt. Dabei handelt es sich sowohl um klinisch etablierte Tumortheraeutika als auch um Verbindungen, die aufgrund ihrer Antitumorwirkung Gegenstand umfangreicher Untersuchungen sind oder waren. Auch hier zeigten die Ergebnisse, dass keiner dieser Stoffe signifikante Korrelationen zu **2e** besitzt, der auf einen ähnlichen Mechanismus der Verbindungen schließen läßt. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Klasse der Darpone die antiproliferative Aktivität über

einen Mechanismus entfaltet, der sich von dem bisher etablierter Antitumorwirkstoffe unterscheidet.¹⁰

Im Selektivitätsmuster der Darpone ist eine besondere Empfindlichkeit gegenüber renalen Krebszelllinien zu erkennen. Untersuchungen von Wosikowski et al. zeigten durch Bestimmung des mRNA-Spiegels in den 60 Zelllinien des NCI-ADS, dass es in renalen Krebszelllinien zu einer starken Überexprimierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor) und des TGF- α (Transforming Growth Factor- α) kommt.¹⁹ Sowohl TGF- α als auch EGF (Epidermal Growth Factor) und Amphiregulin binden an die extrazelluläre Domäne des EGFR.^{20, 21} Durch Bindung eines dieser Wachstumsfaktoren wird die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne aktiviert, die mittels Autophosphorylierung cytoplasmatische Signalkaskaden auslöst, wodurch schließlich die veränderte Genexpression und eine höhere Zellwachstumsrate resultieren. Eine Überexpression des EGFR wurde auch für weitere Krebsarten gefunden.^{21, 22} Aus den von Wosikowski et al. ermittelten mRNA-Spiegeln der 60 Zelllinien des NCI-ADS lässt sich ein Muster konstruieren, welches anschließend als Startdatensatz einer COMPARE-Analyse mit Selektivitätsprofilen von antiproliferativen Stoffen aus der Datenbank des NCI verglichen wurde, die zum Zeitpunkt der Untersuchungen 49000 Stoffe umfasste. Das Darpon **2A** (= NSC 682565) wurde im Vergleich mit dem TGF- α -Expressionsprofil an Position 7 in der Rangliste der insgesamt 49000 Verbindungen aufgeführt. Daraus kann die Arbeitshypothese abgeleitet werden, dass **2A** einen Schritt in der EGFR-assoziierten Signalkaskade hemmt, da die Substanz bevorzugt das Wachstum der Zelllinien unterdrückt, die den EGFR-aktivierenden Liganden TNF- α überdurchschnittlich exprimieren.

Abb. 1-2: Darpon **2A** (= NSC 682565) als möglicher Hemmstoff der EGFR-assozierten Signalkaskade



Die im Arbeitskreis von S.E. Bates am NCI durchgeführten Untersuchungen zur experimentellen Bestätigung dieser Arbeitshypothese zeigten jedoch keine direkte Beeinflussung des EGF-Rezeptors durch Darpone.

Aus den obigen Ausführungen ergeben sich folgende Fragestellungen, die notwendigerweise vor einer weiteren Entwicklung der Darpone zu therapeutischen Zwecken zu beantworten sind:

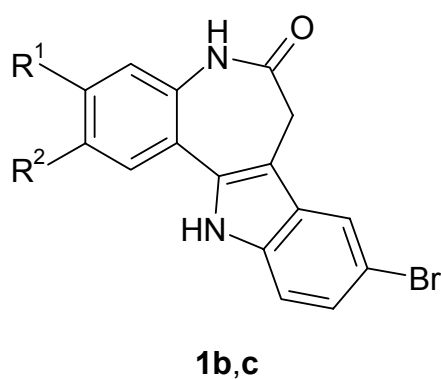
- Welches sind die biologischen Zielstrukturen der Darpone, die für deren antiproliferative Aktivität verantwortlich sind?
- Können wasserlösliche Derivate mit erhaltener antiproliferativer Aktivität synthetisiert werden, die sich für eine Erprobung in weiterführenden Tiermodellen eignen?

1.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen Proteine identifiziert werden, die als biologische Zielstrukturen für die antiproliferative Aktivität der Darpone verantwortlich sind. Dazu sollten Darpone synthetisiert werden, die Seitenketten mit primären Aminogruppen tragen, über die sie an feste Trägerpartikel gebunden werden können. Die so erzeugten Matrices sollten Darpon-affine Proteine aus Zellextrakten binden. Die Identifizierung dieser Proteine sollte zur Klärung des Wirkmechanismus der Darpone beitragen.

Dieses Verfahren wurde in der Vergangenheit bereits erfolgreich an Paullonen durchgeführt, wodurch neben den bereits bekannten Cyclin-abhängigen Kinasen weitere Zielproteine der Substanzklasse ermittelt werden konnten.²³ Bei den Paullonen war es nahe liegend, die für die Anknüpfung vorgesehene Seitenkette in den Positionen 2 oder 3 anzubringen, denn die im Vorweg durchgeführten Struktur-Aktivitätsuntersuchungen hatten gezeigt, dass in diesen Positionen Substituenten ohne Wirkungsabnahme toleriert werden.

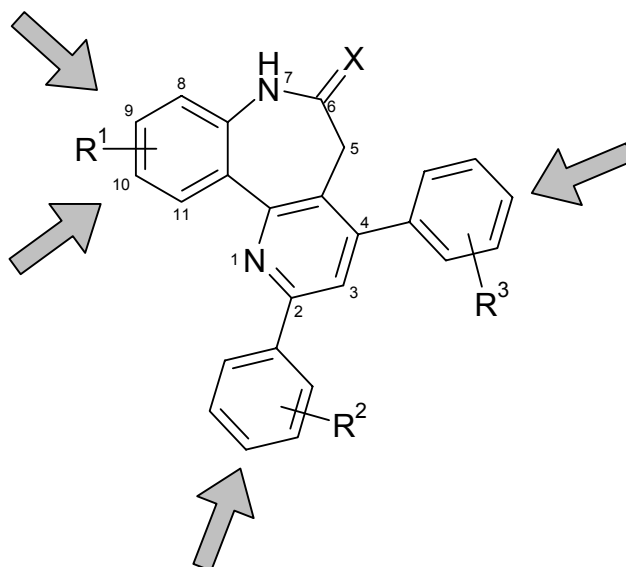
Tab. 1-2: Kenpaullon mit aminogruppenhaltigen Seitenketten



	R ¹	R ²
1b	H ₂ N(CH ₂) ₄ O ⁻	H
1c	H	H ₂ N(CH ₂) ₄ O ⁻

Die Struktur-Aktivitätsuntersuchungen an Darponen zeigten, dass die para-Positionen der Arylreste in 2- und 4- Stellung sowie der Benzanelland des Azepinons Substitutionen ohne Wirkungsverlust tolerieren. Da jedoch noch keine Informationen darüber vorlagen, an welche molekularen Ziele die Darpone angreifen und wie sie sich dabei räumlich in einem aktiven Zentrum orientieren, war die Anbringung der Seitenketten an verschiedenen Positionen der Leitstruktur geplant (siehe Abbildung 1-4). Dadurch sollten sterische Hinderungen durch den Linker bei der Ausrichtung des Darpons in dessen Bindungstasche vermieden werden, die eine Bindung des Zielproteins aus den Zellextrakten verhindert hätten. Die Anknüpfung der Seitenketten sollte durch Williamson-Veretherung oder über Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen erfolgen.

Abb 1-3: Geplante Positionen zur Anknüpfung aminogruppenhaltiger Seitenketten an eine Darponleitstruktur



Darüber hinaus sollten die erzeugten Derivate mit aminogruppenhaltigen Seitenketten in Form ihrer Hydrochloride auf antiproliferative Eigenschaften und verbesserte Wasserlöslichkeit untersucht werden, um so geeignete Darpone für die weitere Testung in verschiedenen Tiermodellen zu ermitteln.

2 Ermittlung einer Darponleitstruktur

Die Ermittlung der Darponleitstruktur soll anhand des Programms COMPARE in Form einer Matrix-Analyse aller im NCI-ADS getesteten Darpone erfolgen. COMPARE ist ein von Ken Paull entwickeltes Computerprogramm,^{15, 16, 24} welches es ermöglicht, die im NCI-ADS erhaltenen Selektivitätsprofile von Substanzen auf statistischem Wege miteinander zu vergleichen.

2.1 Erzeugung eines Selektivitätsprofils im NCI-ADS

In dem Testsystem, welches seit 1990 am NCI etabliert ist, werden 60 humane Tumor-Zelllinien verwendet, die aus verschiedenen humanen Krebserkrankungen stammen. Tumor-Zelllinien aus einer organspezifischen Krebserkrankung werden dabei zu Gruppen zusammengefasst, die als „Subpanels“ bezeichnet werden. Hierzu zählen Leukämie, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolonkarzinom, ZNS-Tumor, Melanom, Ovarialkarzinom, Nierenkarzinom, Prostatakarzinom und Mammakarzinom. In den Untersuchungen werden die Tumorzellen mit fünf verschiedenen Verdünnungen (10^{-4} bis 10^{-8} M) der zu testenden Substanz inkubiert. Nach 48 h wird das Medium entfernt, die Zellen fixiert, gewaschen und anschließend mit dem Farbstoff Sulforhodamin B versetzt. Dieser wird von den verbliebenen Zellen adsorbiert und bindet dort an basische Aminosäurereste von Proteinen. Die Färbung des solubilisierten Rückstands in den Kavitäten der Mikrotiterplatten ermöglicht eine spektralphotometrische Quantifizierung der Zellmasse, aus der sich die prozentuale Zellproliferationsinhibition bestimmen lässt. Die Ergebnisse werden in Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt und für jede Zelllinie folgende Werte errechnet:

- $\log_{10} \text{GI}_{50} [\text{M}]$ (GI = Growth Inhibition; $\text{GI}_{50} [\text{M}]$ = molare Konzentration der Substanz, die eine Hemmung des Tumorzellwachstums um 50% verursacht)

- \log_{10} TGI [M] (TGI = Total Growth Inhibition; TGI [M] = molare Konzentration der Substanz, die eine totale Hemmung des Tumorzellwachstums verursacht)
- \log_{10} LC₅₀ [M] (LC = Lethal Concentration; LC₅₀ [M] = molare Konzentration der Substanz, die ein Absterben von 50% der Tumorzellen verursacht).

Ferner wird von jedem dieser drei Parameter ein Mittelwert der \log_{10} -Werte gebildet, der eine Aussage über die allgemeine, nicht-zelllinienspezifische Antitumoraktivität einer Verbindung zulässt. Für die Berechnung dieser Mittelwerte, den so genannten Meangraph-Midpoints (MG-MID), werden unempfindliche Zelllinien mit der höchsten Testkonzentration (10^{-4} M) einbezogen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form eines Balkendiagramms, welches für die Verbindung **2J** (NSC 682769) in Abbildung 2.1 exemplarisch am Beispiel der \log_{10} GI₅₀-Werte dargestellt ist. In diesem bildet der MG-MID-Wert eine senkrechte Bezugslinie, von der aus die Balken der Zellreihen, deren Empfindlichkeit für die getestete Verbindung unterhalb des MG-MIDs liegt, nach links und für eine Zellreihe mit einer Empfindlichkeit oberhalb des MG-MIDs nach rechts zeigt. Die Länge des Balkens richtet sich nach der Differenz des \log_{10} GI₅₀-Wertes der Zelllinie zum MG-MID-Wert. Konnte für eine Zellreihe keine Wachstumshemmung ermittelt werden, so wird die angegebene höchste Testkonzentration (10^{-4} M) zusätzlich mit einem „>“ gekennzeichnet. Das so erzeugte Balkendiagramm stellt das Selektivitätsprofil einer antiproliferativ wirksamen Substanz dar und erlaubt eine visuelle Beurteilung bezüglich ihrer spezifischen Hemmeigenschaften für einzelne Zelllinien oder der organspezifischen Subpanels. In diesem Beispiel erweist sich die ZNS-Krebszelllinie SNB-75 mit einem MG-MID-Wert von -6.37 als überdurchschnittlich sensitiv gegenüber der Verbindung **2J** (NSC 682769). Ebenso werden renale Krebszelllinien im Allgemeinen stärker als der Durchschnitt im Wachstum gehemmt, während Melanom-Zelllinien kaum Sensitivität gegenüber der Substanz zeigen.

Abb. 2-1: Balkendiagramm-Darstellung der \log_{10} GI₅₀-Werte der Testverbindung **2J** (NSC 682769) mit selektiver in vitro-Antitumoraktivität.

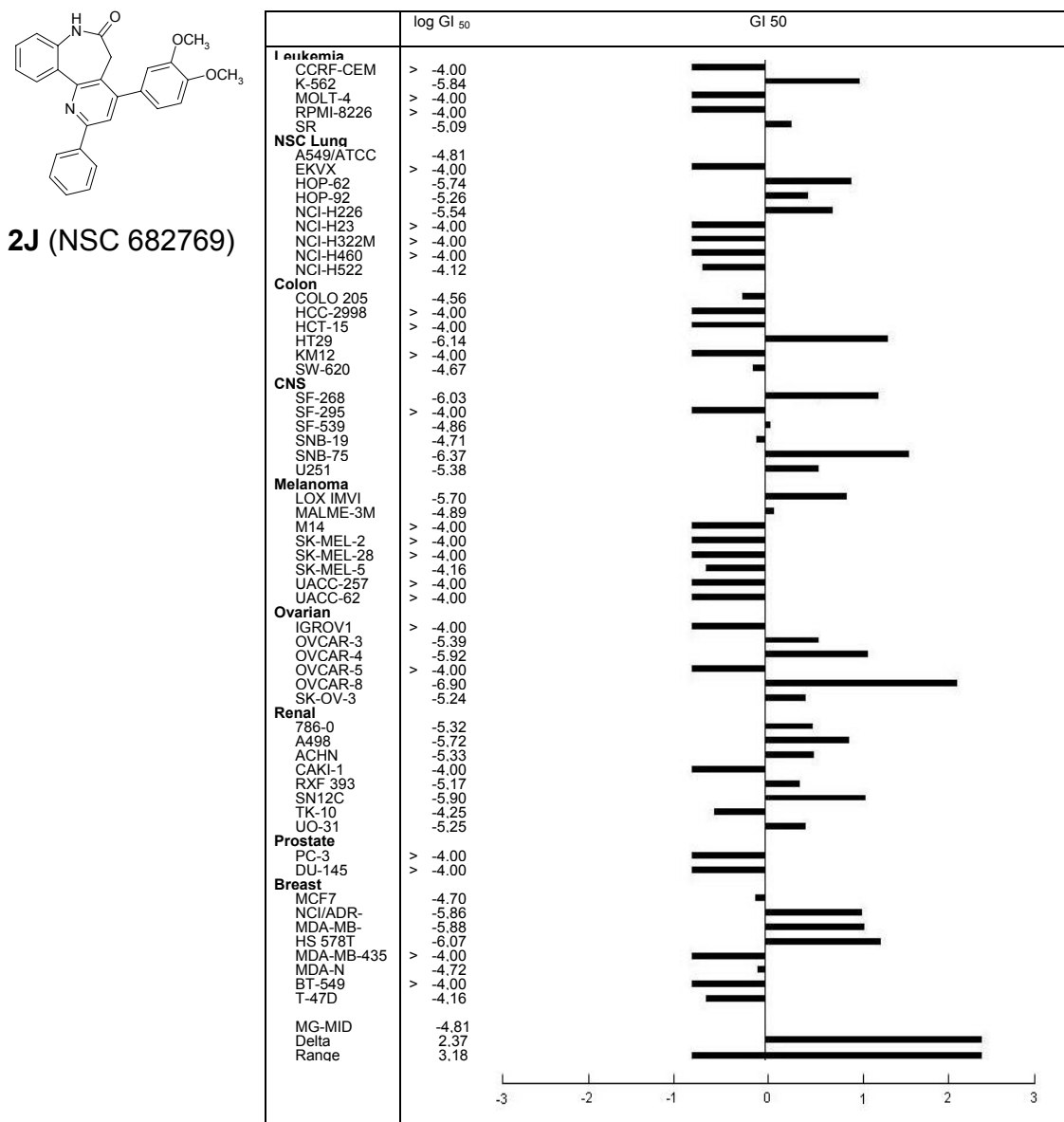


Abb.: Der MG-MID der \log_{10} GI₅₀-Werte bildet die senkrechte Bezugslinie. Die Balken der Zellreihen, deren Empfindlichkeit für die getestete Verbindung unterhalb des MG-MIDs liegen zeigen nach links und für eine Zellreihe mit einer Empfindlichkeit oberhalb des MG-MIDs nach rechts. Die Länge des Balkens richtet sich nach der Differenz des \log_{10} GI₅₀-Wertes der Zelllinie zum MG-MID. Konnte für eine Zellreihe keine Wachstumshemmung ermittelt werden, so wird die angegebene höchste Testkonzentration (10^{-4} M) mit einem „>“ gekennzeichnet.

2.2 COMPARE-Analysen

Die im NCI-ADS erzeugten Datensätze bieten die Grundlage für eine Vielzahl von Auswertungsmöglichkeiten. Als besonders hilfreich und effizient hat sich dabei das COMPARE-Programm von Ken Paull erwiesen.¹⁵ Mit seiner Hilfe lassen sich die Selektivitätsprofile zweier Testverbindungen miteinander vergleichen, indem man Ausrichtung und Länge der Balken miteinander korreliert. Rechnerisch wird dabei für jede Zelllinie die Differenz zum MG-MID gebildet und mit dem entsprechenden Wert der anderen Verbindung verglichen. Basierend auf einem kommerziellen Statistikprogramm wird im Anschluss ein Pearson-Korrelationskoeffizient (Pearson correlation coefficient = PCC) berechnet, der Werte von -1 bis +1 annehmen kann.

Vergleicht man eine Substanz mit sich selbst oder besitzen zwei Substanzen ein identisches Selektivitätsprofil, so erhält man für den PCC einen Wert von 1,0. Existieren bei zwei zu vergleichenden Verbindungen Abweichungen innerhalb der Zelllinien, so sinkt der PCC, bis er bei einem invertierten Profil den Wert von -1,0 einnehmen würde. Je höher der PCC ist, desto wahrscheinlicher ist demnach auch ein gemeinsamer Wirkmechanismus. Korrelationskoeffizienten zwischen 0,6 und 0,8 geben erfahrungsgemäß einen begründeten Hinweis auf einen gemeinsam zugrunde liegenden Wirkmechanismus zweier Substanzen.²⁵ Das COMPARE-Programm bietet vier verschiedene Anwendungsmöglichkeiten:

1.) Aufklärung des Wirkmechanismus einer Ausgangsverbindung:

Das Selektivitätsprofil einer antiproliferativ wirksamen Ausgangsverbindung mit unbekanntem Wirkmechanismus dient hierbei als Startdatensatz für die COMPARE-Analyse. Zum einen kann ein Vergleich mit der Datenbank der 171 "Standard Antitumor Agents" vorgenommen werden, die klinisch etablierte Tumortherapeutika sowie weiterer Verbindungen enthält, deren Antitumorwirkung Gegenstand umfangreicher Untersuchungen war. Zum anderen kann man auf die Datenbank synthetischer Produkte zurückgreifen, die

zum heutigen Zeitpunkt über 43000 getestete Substanzen umfasst. Als Ergebnis werden Stoffe mit absteigenden Pearson-Korrelationskoeffizienten aufgelistet, wobei eine hohe Korrelation zu Stoffen mit bekanntem Wirkmechanismus auf einen gemeinsamen Mechanismus hinweist.²⁵

2.) Ermittlung neuer Leitstrukturen für bekannte Ziele der Antitumorthherapie:

Benutzt man das Selektivitätsprofil einer antiproliferativ wirksamen Ausgangsverbindung mit bekanntem Wirkmechanismus als Startdatensatz für die COMPARE-Analyse, so kann man anhand der ausgegebenen Liste Stoffe mit hohem Korrelationskoeffizienten selektieren, deren Wirkmechanismus bislang unbekannt war. Hierdurch besteht die Möglichkeit neue chemische Leitstrukturen für bekannte Zielstrukturen der Antitumorthherapie aufzufinden.

3.) Leitstrukturen für neuartige Zielstrukturen in der Antitumorthherapie:

Wie eingangs erwähnt besteht die Möglichkeit, das Expressionsmuster einer potentiellen molekularen Zielstruktur für Antitumorwirkstoffe in den 60 Zelllinien des NCI-ADS als Startdatensatz zu verwenden.¹⁹ Auf die Weise lassen sich Stoffe aus der NCI-Datenbank ermitteln, deren Selektivitätsprofil dem ermittelten Expressionsmuster entspricht und die somit als Leitstrukturen neuartiger Antitumorwirkstoffe dienen können.

4.) Matrix-COMPARE- und Clusteranalysen

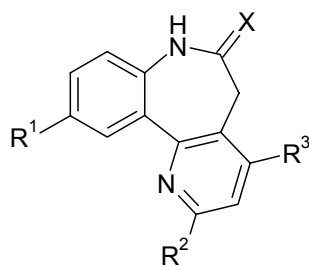
Ein interessantes neues Gebiet der Musteranalysen bilden die computerunterstützten Clusteranalysen, bei denen Gruppen von Wirkstoffen mit gemeinsamen molekularen Angriffspunkten gebildet werden können.¹⁷ Das Werkzeug hierzu stellt im Kleinen die Matrix-COMPARE-Analyse dar. Mit ihrer Hilfe lassen sich Strukturunterschiede innerhalb einer Substanzfamilie aufzeigen und mit dem Muster der antiproliferativen Aktivität korrelieren.²⁶ Der Benutzer wählt hierzu aus der NCI-Datenbank eine definierte Anzahl von Substanzen aus, von denen alle paarweise miteinander verglichen werden. Die ermittelten Pearson-Korrelationskoeffizienten werden anschließend in Form einer Matrix ausgegeben.

Im Folgenden wird beschrieben, wie durch Matrix-COMPARE-Analyse aus der Substanzfamilie der Darpone eine Verbindung ermittelt wurde, die ein für die Verbindungsklasse besonders typisches Selektivitätsprofil aufweist. Diese Verbindung sollte anschließend bei den Synthesen von Darponderivaten zum Zweck der Targetidentifizierung als Leitstruktur dienen.

2.3 Matrix-COMPARE-Analyse der Darponbibliothek

Diaryl-substituierte Pyrido[3,2-*d*][1]benzazepine (Darpone) wurden 1995 erstmals von Kunick et al. als neues heterocyclisches Ringsystem in der Literatur beschrieben.⁸ Der Entdeckung der antiproliferativen Eigenschaften dieser Substanzklasse folgten umfassende Modifikationen der Leitstruktur **2**,⁹ die zu 44 im 60 Zelllinien-Screening des NCI-ADS getesteten Verbindungen führten (Siehe Tabelle 2.1).

Tab. 2-1: Darponbibliothek mit zugehörigen NSC-Nummern und MG-MID der log₁₀GI₅₀-Werte



Ver- bindung	NSC- Nr.	X	R ¹	R ²	R ³	MG- MID ^a
2A	682765	O	H	4-Cl-Ph	Ph	-5,3
2B	684480	O	H	3-Cl-Ph	Ph	-5,5
2C	682764	O	H	Ph	4-Cl-Ph	-5,2
2D	684475	O	Br	Ph	Ph	-5,5
2E	684478	O	H	1,3-Benzodioxol-5-yl	Ph	-5,3
2F	673435	O	H	Ph	Ph	-5,3
2G	682766	O	H	4-MeO-Ph	Ph	-4,4
2H	682767	O	H	Ph	2-Thienyl	-4,5
2I	682768	O	H	2-Naphthyl	Ph	-5,0
2J	682769	O	H	Ph	3,4-Di-MeO-Ph	-4,7
2K	684449	O	H	2-Naphthyl	4-Cl-Ph	-5,1
2L	684450	O	H	Ph	2-Pyridyl	-4,4
2M	684451	O	H	4-OH-Ph	Ph	-5,1
2N	684452	O	H	Ph	4-Br-Ph	-5,3

Die Fortsetzung der Tabelle erfolgt auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tab. 2-1:

Ver- bindung	NSC- Nr.	X	R ¹	R ²	R ³	MG- MID ^a
2O	684477	O	H	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	-4,8
2P	684479	O	H	Ph	4-MeO-Ph	-5,0
2Q	684482	O	H	Ph	3-Cl-Ph	-5,1
2R	686448	O	Br	Ph	4-Br-Ph	-6,1
2S	686449	O	H	2-Cl-Ph	Ph	-4,6
2T	686454	O	H	2-Thienyl	Ph	-4,6
2U	686461	O	H	4-OH-Ph	4-OH-Ph	-5,3
2V	686462	O	H	Ph	4-OH-Ph	-5,3
2W	701619	O	H	2-Furyl	Ph	-5,1
2X	701623	O	H	Ph	2-Furyl	-4,7
2Y	701624	O	H	2-Furyl	2-Furyl	-4,7
2a	673436	S	H	Ph	Ph	-5,0
2b	682771	S	H	4-Cl-Ph	Ph	-5,6
2c	684481	S	H	3-Cl-Ph	Ph	-5,6
2d	684455	S	H	2-Naphthyl	4-Cl-Ph	-5,1
2e	684453	S	H	Ph	2-Thienyl	-5,5
2f	682770	S	H	Ph	4-Cl-Ph	-4,9
2g	684454	S	H	Ph	3,4-DiMeO-Ph	-5,6
2h	684456	S	H	4-MeO-Ph	Ph	-5,5
2i	684457	S	H	Ph	2-Pyridyl	-5,0
2j	684458	S	H	2-Naphthyl	Ph	-5,5
2k	684459	S	H	Ph	4-Br-Ph	-5,6
2l	684476	S	Br	Ph	Ph	-5,4
2m	684483	S	H	Ph	3-Cl-Ph	-4,5
2n	686450	S	H	2-Cl-Ph	Ph	-4,1
2o	686451	S	H	Ph	4-MeO-Ph	-5,1
2p	686452	S	H	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	-5,4
2q	686453	S	H	1,3-Benzodioxol-5-yl	Ph	-5,4
2r	686455	S	H	2-Thienyl	Ph	-5,2
2s	701620	S	Br	Ph	4-Br-Ph	-5,1

^a MG-MID: Mittelwert der \log_{10} GI₅₀ Werte aller Zelllinien einer im NCI-ADS getesteten Substanz. Bei mehreren Testläufen für eine Substanz wird der MG-MID als Mittelwert angegeben.

Die Selektivitätsprofile dieser Substanzbibliothek sollten mit Hilfe des COMPARE-Programms einer Matrixanalyse unterzogen werden, um eine passende Leitstruktur aus der Darponbibliothek zu ermitteln. Hierzu wurde jede Verbindung paarweise mit einer anderen aus der Gruppe verglichen und das Ergebnis in Form des PCCs in einer Tabelle festgehalten, die demnach 44 Zeilen und 44 Spalten aufweist. In der Hauptdiagonalen dieser so entstandenen Matrix stehen die Felder, in denen eine Substanz mit sich selbst verglichen wird und somit einen PCC von 1,0 aufweist.

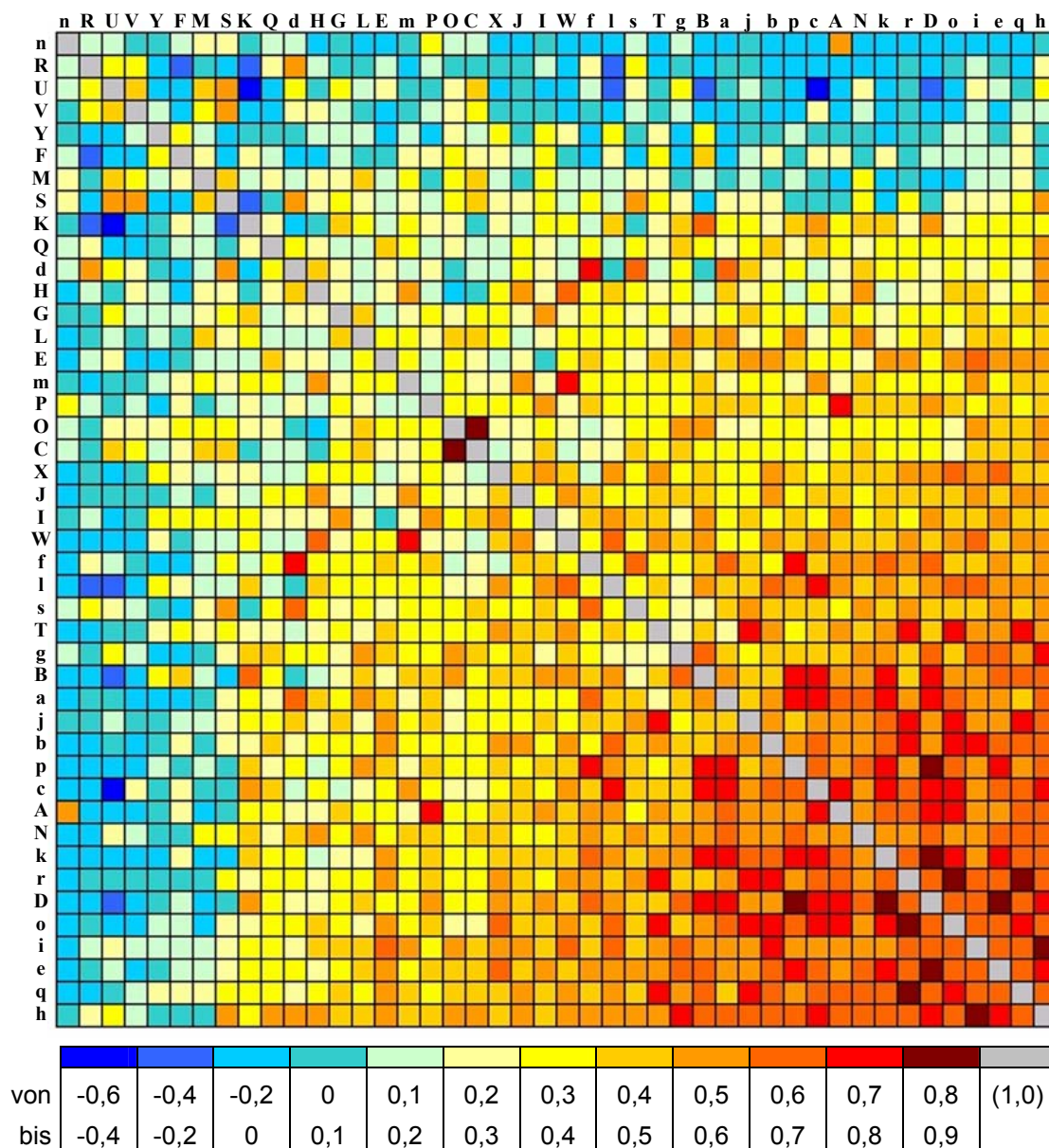
Aus der erhaltenen Matrix wurde für jede Verbindung ein Mittelwert aus den errechneten PCCs gebildet und im Anschluss der Größe nach geordnet (Abbildung 2-2). Die Hauptdiagonalfelder mit den PCCs von 1,0 blieben in der Auswertung unberücksichtigt. Ist der errechnete Mittelwert hoch, so besitzt das Selektivitätsprofil dieser Verbindung große Ähnlichkeit zu einer Vielzahl der anderen Darpone. Bei einem kleinen Mittelwert ist davon auszugehen, dass die Substanz einen atypischen Vertreter der Darpone darstellt. Die Ergebnisse der besten und schlechtesten fünf mittleren Korrelationen sind in der Tabelle 2-2 wiedergegeben.

Tab. 2-2: Ergebnis der Matrix-COMPARE-Analyse: Die fünf besten und fünf schlechtesten Vertreter der Darpone nach absteigenden mittleren Korrelationskoeffizienten.

Mittlere Korrelation ^a	Verbindung	NSC-Nr.	MG-MID ^b
0,516	2h	684456	-5,5
0,474	2e	686453	-5,5
0,468	2q	684453	-5,4
0,466	2i	684457	-5,0
0,446	2o	686451	-5,5
0,100	2Y	701624	-5,3
0,078	2V	686462	-5,3
0,070	2U	686461	-4,7
0,040	2R	686448	-6,1
0,017	2n	686450	-4,1

^a Mittelwert der errechneten Pearson-Korrelations-Koeffizienten. ^bMG-MID: Mittelwert der log₁₀ GI₅₀ Werte aller Zelllinien einer im NCI-ADS getesteten Substanz.

Abb. 2-2: Ergebnisse der Matrix-COMPARE-Analyse mit der Darponfamilie



Matrix-COMPARE-Analyse: Hierzu wurde jede der 44 Verbindungen paarweise mit einer anderen aus der Gruppe verglichen und der Korrelationswert (PCC = Person Correlation Coefficient) bestimmt. Die Bezeichnung der Spalten, bzw. Zeilen entsprechen denen der Leitstrukturderivate **2A-Y, a-s**. Dem PCC wird je nach numerischem Wert eine Farbe anhand der abgebildeten Legende zugeordnet. Im Anschluss wurden die Verbindungen der Größe ihrer mittleren PCCs nach geordnet, sodass in der resultierenden achsensymmetrischen Matrix Darpone mit niedrigen mittleren PCCs („atypische“ Darpone) am linken Rand, bzw. oben stehen. „Typische“ Darpone mit hohen mittleren PCCs befinden sich dagegen rechts, bzw. im unteren Teil der Matrix.

Die Ergebnisse der Matrix-COMPARE-Analyse bestätigen einen in der Literatur beschriebenen Effekt, der bei eingeschränkter Drehbarkeit des 2-Phenylsubstituenten auftritt. Das Darpon **2n**, dessen mittlere Korrelation mit einem Wert von 0,010 am niedrigsten ausfällt, trägt in der 2. Position einen 2-Chlorphenylrest, der durch den Orthochlorsubstituenten in eine orthogonale Stellung relativ zum Pyridinring gezwungen wird. Dieses hat einen dramatischen Wirkungsverlust zufolge,⁹ der nach diesen Analysen auch mit einem deutlichen Verlust des „darpontypischen“ Selektivitätsprofils einhergeht. Das analoge Lactam **2S** befindet sich ebenfalls unter den zehn Verbindungen mit der niedrigsten mittleren Korrelation. Das Darpon **2R** besitzt dagegen exzellente Hemmeigenschaften (MG-MID = -6,1), weist jedoch ebenfalls mit einer mittleren Korrelation von nur 0,069 ein „atypisches“ Selektivitätsprofil auf.

Die Tatsache, dass die Korrelationswerte „atypischer“ Darpone in der Auswertung der Matrix-COMPARE-Analyse mit einfließen, bewirkt eine Schmälerung der Korrelationswerte der Darpone, die zu dem Cluster der typischen Vertreter zählen. Um diesen Effekt zu umgehen wurde ein Verfahren angewendet, in dem schrittweise die Verbindung mit der niedrigsten mittleren Korrelation aus der Matrix eliminiert wird. Anschließend wurden die Mittelwerte neu berechnet und diese Prozedur so lange wiederholt, bis ein Cluster von 15 Darponen verblieb (siehe Anhang 2.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tab. 2-3: Ergebnis der Matrix-COMPARE-Analyse nach Eliminierung der atypischen Darpone. Cluster der besten 15 Darpone nach absteigenden mittleren Korrelationen.

Mittlere Korrelation	Verbindung	NSC-Nr.	MG-MID
0,720	2D	684475	-5,5
0,702	2k	684459	-5,6
0,681	2h	684456	-5,5
0,680	2e	684453	-5,5
0,679	2o	686451	-5,1
0,669	2b	682771	-5,6
0,658	2c	684481	-5,6
0,657	2r	686455	-5,2
0,648	2q	686453	-5,4
0,633	2j	684458	-5,5
0,622	2a	673436	-5,0
0,622	2i	684457	-5,0
0,619	2A	682765	-5,3
0,611	2B	684480	-5,5
0,592	2N	684452	-5,3

^a Mittelwert der errechneten Pearson-Korrelations-Koeffizienten. ^bMG-MID: Mittelwert der \log_{10} GI₅₀ Werte aller Zelllinien einer im NCI-ADS getesteten Substanz.

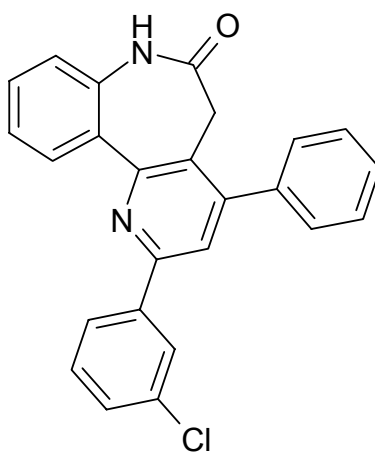
Durch den Wegfall der atypischen Vertreter resultieren stark erhöhte mittlere Korrelationswerte im Vergleich zur ursprünglichen Matrix. Für die Auswahl einer Leitstruktur müssen jedoch weitere Aspekte berücksichtigt werden. Das Darpon **2D** weist unter allen Darponen mit einem Wert von 0,720 die beste mittlere

Korrelation zu den anderen vierzehn Verbindungen auf. Wie eingangs erwähnt, war diese Substanz bereits Gegenstand weiterführender Untersuchungen in Form von Hohlfasertests. In diesem schnitt **2D** jedoch unbefriedigend ab, da es keine der drei erforderlichen Kriterien für eine weitere Entwicklung erfüllte. Da die in den geplanten Synthesen erzielten aminogruppenhaltigen Derivate einer Leitstruktur ggf. Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen im Tiermodell darstellen sollen, scheint Verbindung **2D** für die Wahl der Leitstruktur nicht geeignet zu sein. In den nächsten elf Rängen folgen Darpone mit Thiolactamstruktur, von denen vier ebenfalls die Hohlfasertests durchlaufen haben. Während **2a** unbefriedigend abschnitten, erfüllten Verbindung **2b**, **2c** und **2e** mindestens ein Kriterium zur Weiterentwicklung. Die enthaltene Thiolactamstruktur bringt jedoch mehrere Nachteile mit sich. Zum einen bedingt sie, als Folgeprodukt des Lactams nach Umsetzung mit Phosphorpentasulfid,⁸ einen weiteren Reaktionsschritt, der bei substituierten Darponen lediglich in moderaten Ausbeuten gelingt.⁹ Zum anderen würde eine Anbringung von Linkern durch die Williamson-Ethersynthese problematisch werden, da es bei Umsetzung von Thiolactamen mit primären Halogenalkanen zur Ausbildung des Thiolactim-Ethers kommt.⁸ Diese Konkurrenzreaktion, sowie die allgemein erhöhte Empfindlichkeit bezüglich möglicher Nebenreaktionen lässt eine Verwendung eines Darpons mit Thiolactamstruktur als ungünstig für die Wahl als Leitstruktur erscheinen.

Auf Rang dreizehn folgt Darpon **2A**, welches aus den gleichen Gründen wie bereits **2D** ausscheidet. Hingegen weist das Darpon **2B** (NSC 684480) an vierzehnter Stelle eine Lactamfunktion auf und besitzt neben einer guten mittleren Korrelation von 0,622 zu den restlichen Vertretern einen ebenfalls guten MG-MID Wert von -5,5. Verbindung **2B** wurde ebenfalls für die Hohlfasertests ausgewählt und erfüllte dabei zwei der drei Kriterien zur Weiterentwicklung, darunter die totale Wachstumshemmung der implantierten Krebszellen. Da sich der einzige Substituent in 3-Position am 2-Phenylring befindet, ist die Anbringung eines Linkers in para-Stellung nicht behindert.

Unter Berücksichtigung dieser Erwägungen wurde **2B** aus dem Cluster der Darpone mit den 15 besten mittleren Korrelationen als eine optimale Leitstruktur für die geplanten Modifikationen ausgewählt.

Abb. 2-2: Durch Auswahl der Matrix-COMPARE-Analysendaten ermittelte Leitstruktur **2B** der Darpon-Substanzklasse



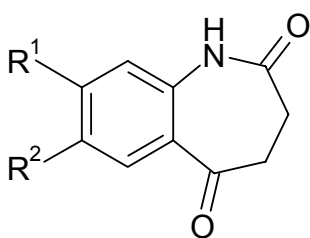
2B (NSC 684480)

3 Synthesen

3.1 Methoden zur Darstellung von 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dionen

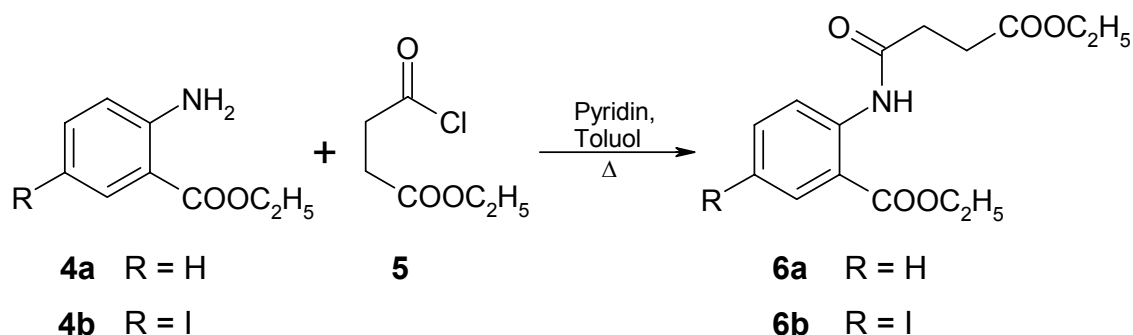
Als Ausgangsverbindungen für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Pyrido[3,2-*d*][1]benzazepinone dienten das 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion **3a**, sowie die am Benzanellanden substituierten Derivate **3b** und **3c**.

Tab. 3-1: Geplante 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dione

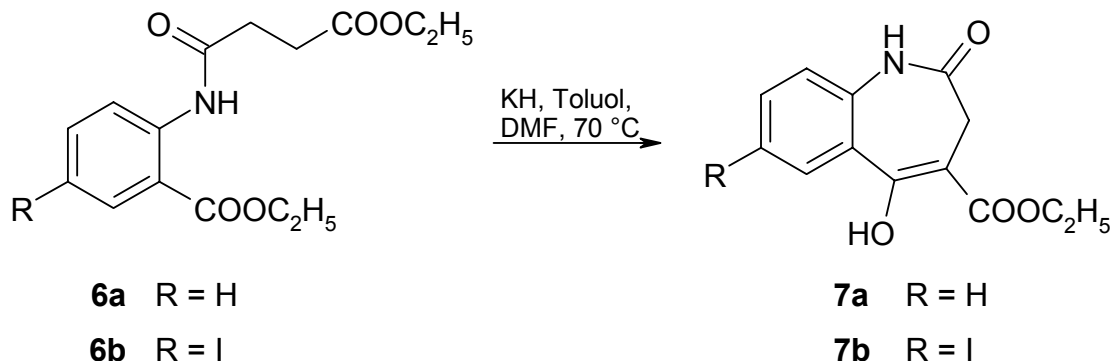


	R ¹	R ²
3a	H	H
3b	H	I
3c	-OCH ₃	H

Die Verbindungen **3a** und **3b** wurden ausgehend von den Anthranilsäureethylestern **4a** und **4b** über die von Kunick et al.^{27, 28} publizierten Synthesewege erschlossen. Hierzu erfolgte zunächst die Umsetzung von **4a** und **4b** mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**5**) unter Zusatz von Pyridin zu den Amiden **6a** und **6b** (Schema 3-1).

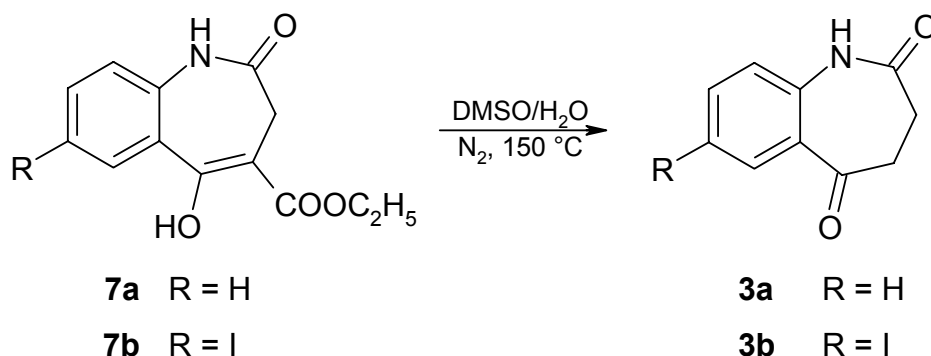
Schema 3-1: Umsetzung der Aniline mit Bernsteinsäureethylesterchlorid

Mittels Kaliumhydrid gelang die Cyclisierung der Amide **6a** und **6b** in einer Dieckmann-Ester-Kondensation zu den 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]-benzazepin-4-carbonsäureethylestern **7a** und **7b** (Schema 3-2).

Schema 3-2: Cyclisierung durch Esterkondensation zum Benzazepin

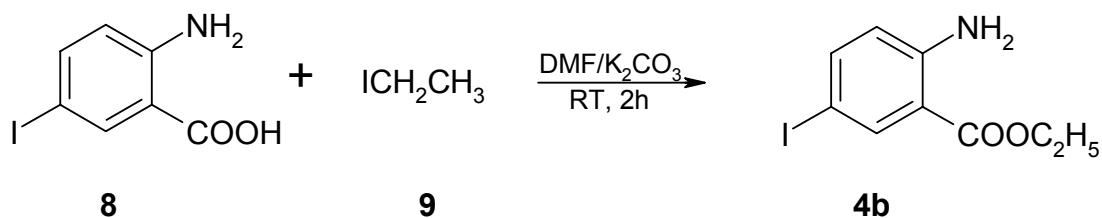
Bei der Umsetzung der 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]-benzazepin-4-carbonsäureethylestern in wasserhaltigem DMSO kommt es bei 150 °C zur Dealkoxycarbonylierung. Auf diese Weise wurden die gewünschten 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dione **3a** und **3b** erhalten (Schema 3-3).

Schema 3-3: Dealkoxycarbonylierung zum Benzazepindion **3a** und **3b**



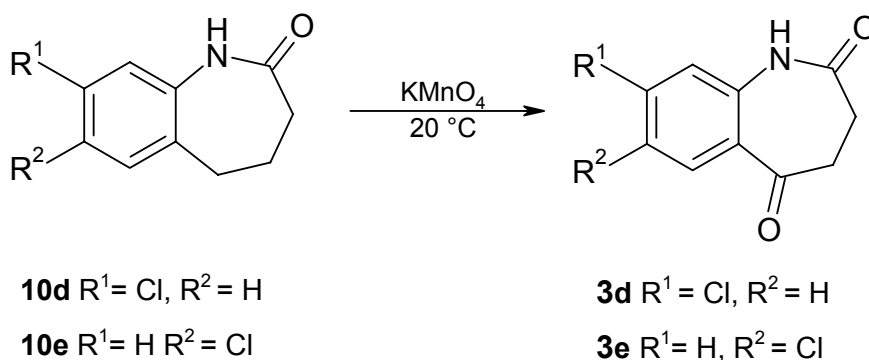
Der Anthranilsäureester **4b** war kommerziell nicht erhältlich und wurde daher nach der von Kunick²⁸ beschriebenen und von Xie²⁹ abgewandelten Methode aus der 2-Amino-5-iod-benzoesäure (**8**) mittels Ethyliodid (**9**) in DMF hergestellt (Schema 3-4).

Schema 3-4: Veresterung der 2-Amino-5-iod-benzoesäure (**8**)



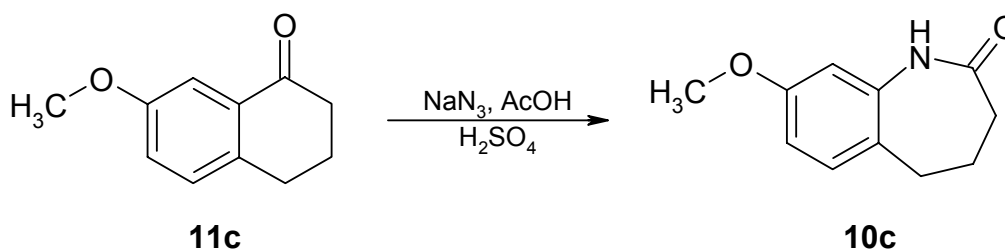
Die Synthese des 8-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dions (**3c**) erfolgte nach einer von Chen und Gilman³⁰ erstmals beschriebenen Methode. Durch Umsetzung der Benzazepinone **10d** und **10e** mit Kaliumpermanganat erhielten sie die Chlorbenzazepindione **3d** und **3e** (Schema 3-5).

Schema 3-5: Oxidation zum 7- und 8- Chlorbenzazepindion **3d** und **3e**



Wieking³¹ gelang die Übertragung dieser Methode auf die Synthese von **3c**, ausgehend von 7-Methoxy-1-tetralon (**11c**). Dieses wurde zunächst in einer Schmidt-Reaktion zum 8-Methoxy-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-[1]benzazepin-2-on (**10c**) umgesetzt (Schema 3-6).

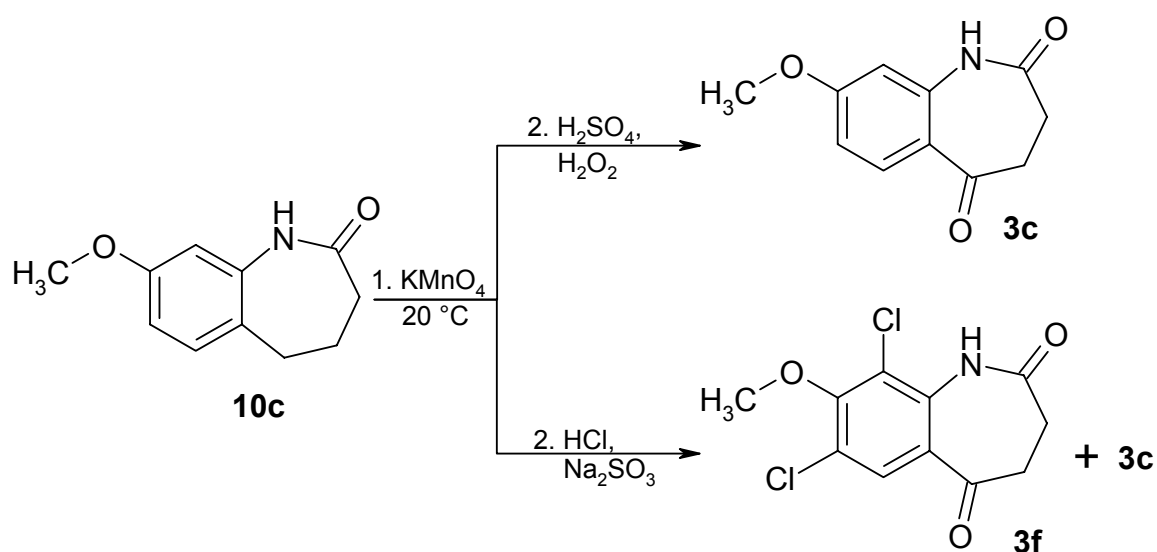
Schema 3-6: Ringerweiterung durch Schmidt-Reaktion am Methoxytetralon **11c**



Die bevorzugte Wanderung des Arylrestes bei dieser Reaktion wurde bereits von Tomita³² beschrieben und konnte später anhand von NOE-Experimenten durch Wieking für **10c** eindeutig belegt werden.³³ Im Anschluss erfolgte die selektive Oxidation der Methylengruppe in Position 5 mit Kaliumpermanganat, wobei überschüssiges Oxidationsmittel nach Beendigung der Reaktion mit Natriumbisulfit/Salzsäure entfernt wurde. Bei der Reproduktion der von Wieking beschriebenen Bedingungen kam es jedoch zu einer Oxidation des Chlorids zum Chlor, das in der Folge zur Bildung des dichlorierten Nebenproduktes **3f**

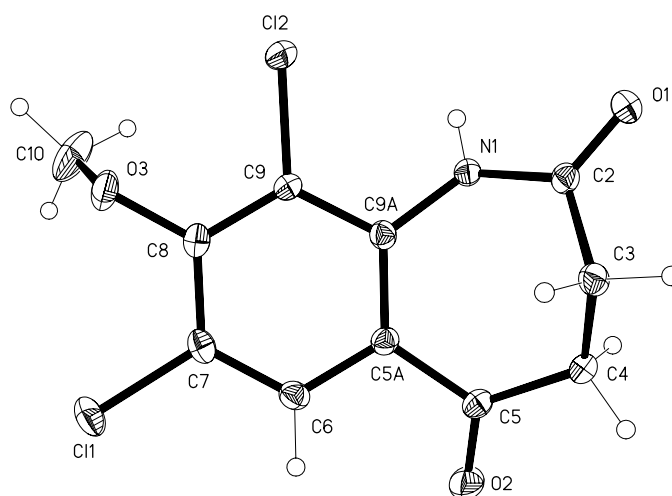
durch elektrophile Substitution am Aromaten führte. Daher wurde der Ansatz zur Aufarbeitung mit einer 10prozentigen Schwefelsäure/Wasserstoffperoxid-Lösung bis zum Verschwinden der violetten Färbung titriert, wodurch die Entstehung des Nebenproduktes **3f** verhindert und die Ausbeute des gewünschten Ketons **3c** von 17 auf 42 Prozent gesteigert werden konnte (Schema 3-7).

Schema 3-7: Oxidation zum Methoxybenzazepindion **3c**



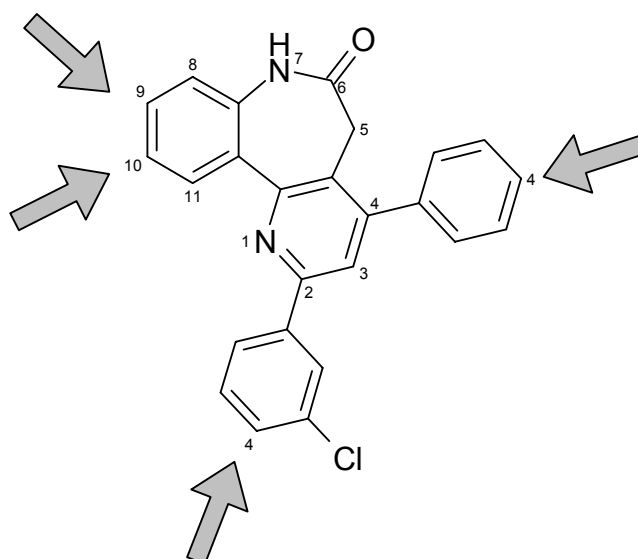
Die röntgenkristallographische Analyse (Abbildung 3-1) lieferte den eindeutigen Strukturnachweis des 7,9-Dichloro-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dions (**3f**).

Abb. 3-1: Röntgenkristallstruktur des dichlorierten Nebenproduktes **3f**



Die Verbindung **3a** diene als Ausgangsprodukt für die 2,4-Diaryl-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepinone, an denen die Seitenkette mittels der Williamson-Veretherung an den Phenylresten in Position 2 oder 4 angeknüpft werden sollte. Für **3c** sollte dieses über die 9-Position des Darpon-Grundgerüsts geschehen. An dem aus **3b** resultierenden Iod-substituierten Darpon sollte die Anknüpfung der Seitenkette in Position 10 durch Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen erfolgen.

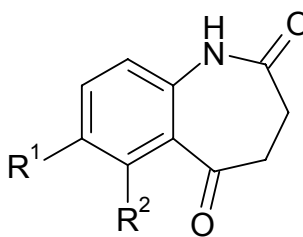
Abb. 3-2: Anbindungsstellen für Seitenketten an der Leitstruktur



3.1.1 Oxidationsversuche mit 1,3,4,5-Tetrahydro-2H-[1]benzazepin-2-onen

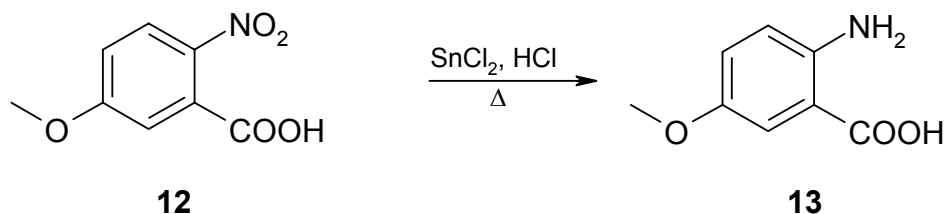
Im Hinblick auf eine vereinfachte Synthese entsprechender Benzazepindione wurde untersucht, ob sich die in 6- bzw. 7-Position methoxysubstituierten Verbindungen **3g** und **3h** ebenfalls nach der Methode von Chen und Gilman herstellen lassen.³⁰

Tab. 3-2: Geplante Produkte nach der Methode von Chen und Gilman

		
	R ¹	R ²
3g	OCH ₃	H
3h	H	OCH ₃

Während **3h** bislang noch nicht in der Literatur beschrieben worden ist, erfolgt die publizierte Synthese von **3g** analog der Methode von Kunick zur Darstellung von Benzazepindionen.²⁷ Diese geht von der 5-Methoxy-2-nitrobenzoesäure (**12**) aus, die zunächst mit Zinn(II)chlorid zur entsprechenden Anthranilsäure **13** reduziert werden muss (Schema 3-8).

Schema 3-8: Reduktion von 5-Methoxy-2-nitrobenzoesäure (**12**) mit Zinnchlorid

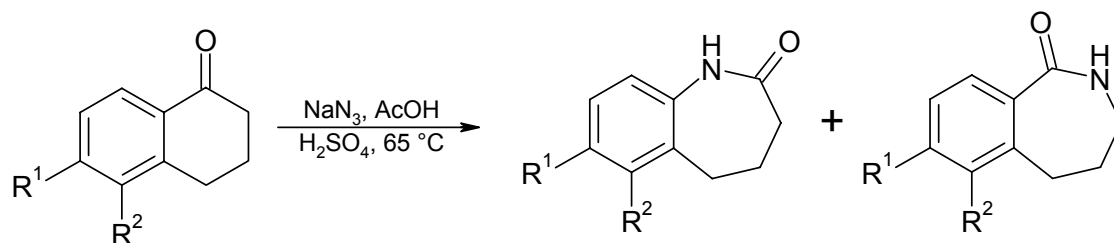


Die anschließenden Reaktionen verlaufen analog zur Synthese des 7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dions (**3b**) (vergl. Schemata 3-1 bis 3-4).³¹

Eine Synthese von **3g** über den Weg nach Chen³⁰ würde somit eine gute Alternative zu dem fünfstufigen etablierten Verfahren darstellen.

Die Ausgangsverbindungen für die Oxidationen wurden über eine Schmidt-Reaktion aus den Tetralonen **11a** und **11b** erschlossen. Tomita et al. zeigten, dass das Produktverhältnis zwischen der Alkyl- und Arylwanderung für Methoxytetralone im Wesentlichen durch die Position des Substituenten bestimmt wird, während die gewählten Reaktionsbedingungen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.³² Bei der Schmidt-Reaktion des 6-Methoxy-1-tetralons (**11a**) erfolgte eine bevorzugte Alkylwanderung zum 2-Benzazepin-1-on **14a** im Verhältnis von 3:2, wie es auch für die Beckmann-Umlagerung an **11a** beschrieben worden ist.^{34, 35} Die Darstellung von 7-Methoxy-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-[1]benzazepin-2-on (**10a**) erfolgte mit Natriumazid in Eisessig unter Zusatz von Schwefelsäure mit anschließender säulenchromatographischer Abtrennung des Nebenproduktes **14a**. Befindet sich der Methoxysubstituent in meta-Stellung zur Carbonylfunktion des Tetralons, tritt bevorzugt eine Wanderung des Arylrestes ein.^{32, 36} So konnte bei der Umsetzung von **11b** das 6-Methoxy-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-[1]benzazepin-2-on (**10b**) als Hauptprodukt isoliert werden. Die Reaktionen sind im Schema 3-9 zusammengefasst.

Schema 3-9: Schmidt-Reaktion am 5- und 6-Methoxytetralon **11a** und **11b**



11a $R^1 = -\text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$

11b $R^1 = \text{H}$, $R^2 = -\text{OCH}_3$

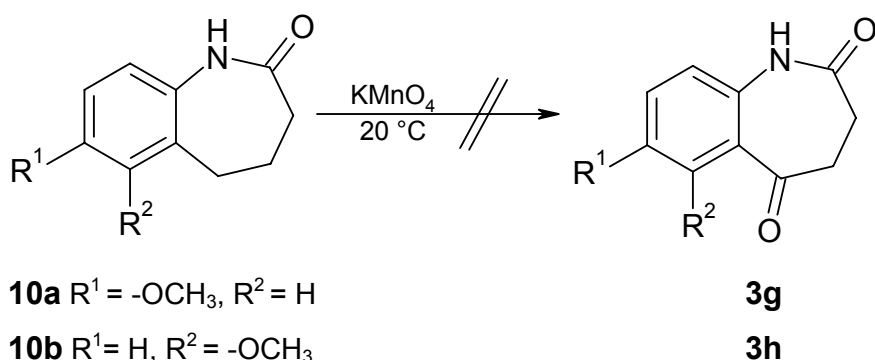
10a $R^1 = -\text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$

10b $R^1 = \text{H}$, $R^2 = -\text{OCH}_3$

14a $R^1 = -\text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$

Die anschließende Oxidation der Benzazepinone **10a** und **10b** mittels Kaliumpermanganat gelang unter den für die Darstellung von **3c** erarbeiteten Bedingungen jedoch nicht. Auch mit bezüglich der Reaktionszeiten und Stoffmengenverhältnissen variierten Parametern konnte nur das jeweilige Edukt aus den Ansätzen isoliert werden (Schema 3-10).

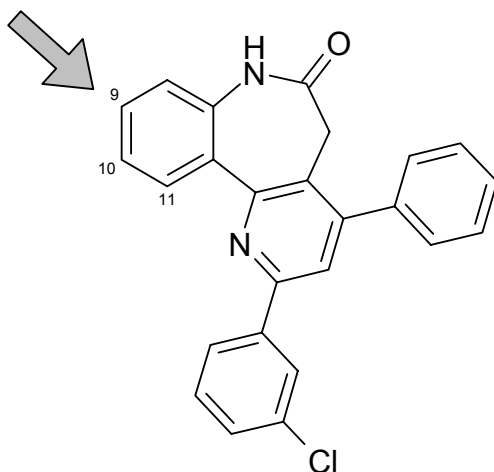
Schema 3-10: Oxidationsversuche mit Kaliumpermanganat



Bei Edukt **10b** scheint die räumliche Nähe des Substituenten den oxidativen Angriff des Permanganats sterisch zu behindern, wodurch die Reaktion wahrscheinlich ausblieb. Ungeklärt bleibt jedoch die Frage, warum das Chlorbenzazepinon **10e** (siehe Kapitel 3.1) oxidierbar ist, während das strukturanaloge Methoxyderivat **10a**, bei ähnlichen mesomeren und induktiven Effekten des Substituenten, keine Reaktion zeigte.

Aufgrund der aufwendigen Synthese des Benzazepinons **3g** sowie der fehlgeschlagenen Darstellung von **3h** wurde darauf verzichtet, die Position 10 und 11 für die Einführung von Ether-verknüpften Seitenketten in den geplanten Darponen vorzusehen (siehe Abbildung 3-3). Lediglich das leicht zugängliche Edukt **3c** mit der Methoxygruppe in 8-Position wurde für eine Anknüpfung der Seitenkette über den Benzannellanden verwendet, woraus die in 9-Position substituierten Darpone resultierten.

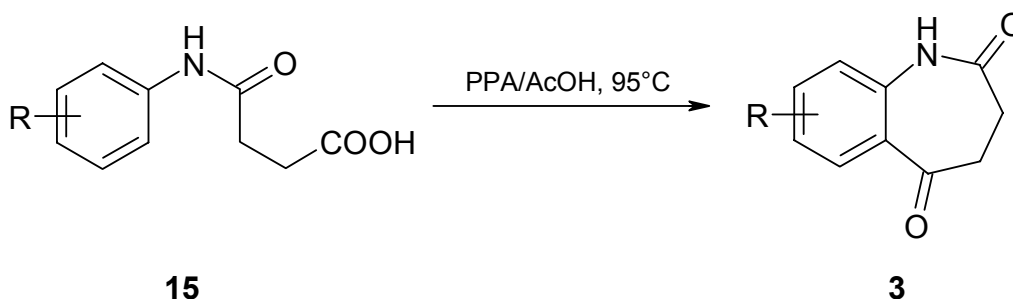
Abb. 3-3: Die aus den Ergebnissen der Oxidationsversuche resultierende Anbindungsstelle für die Einführung Ether-verknüpfter Seitenketten am Benzannellanden der Leitstruktur



3.1.2 Alternative Synthese von 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dionen

Bhusare et al. beschreiben eine alternative Methode zur Darstellung von 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dionen.^{37, 38} Bei dieser kondensieren Bernstein-säuremonoanilide **15** in einer intramolekularen Friedel-Crafts-Acylierung zu den gewünschten Benzazepindionen **3** (Schema 3-11).

Schema 3-11: Intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung nach Bhusare^{37, 38}



Die aufgeführten analytischen Daten der so erschlossenen 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dione entsprechen jedoch in vielen Aspekten nicht den literaturbekannten Werten. Wie anhand der Tabelle 3-3 zu erkennen ist, weichen die ermittelten Schmelzpunkte der Verbindungen **3a,e,g** und **i** und stark von den Literaturwerten ab.

Tab. 3-3: Schmelzpunkte der in Position 7-substituierten 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dione (**3**) nach Bhusare im Vergleich zu bekannten Literaturwerten

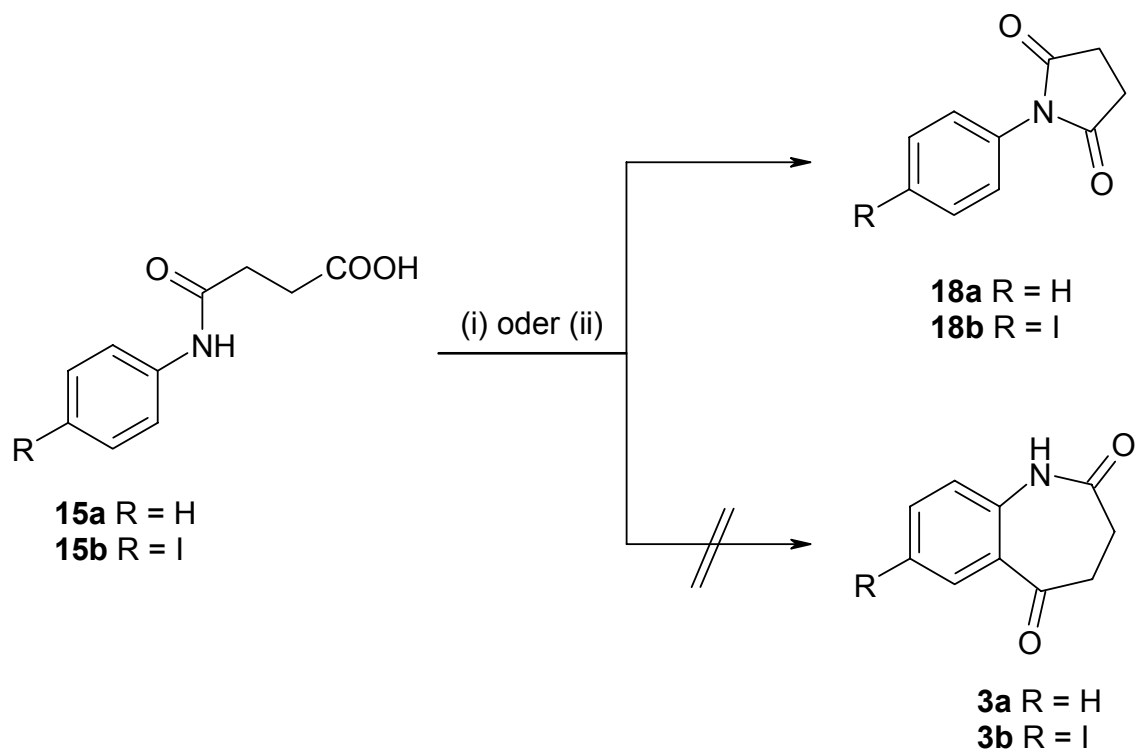
Verbindung	Substitution	Bhusare et al.	Literatur Schmp.
3a	7-H	145 °C ³⁷	187-188 °C ²⁷
3e	7-Cl	121 °C ³⁸	201-206 °C ³⁰
3g	7-MeO	221 °C ³⁸	181 °C ³¹
3i	7-Br	125 °C ³⁷	218-219 °C ²⁷

Die aufgeführten Argumente rechtfertigten eine Überprüfung der beschriebenen Methode nach Bhusare anhand der Darstellung des 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dions (**3a**). Die Untersuchung sollte dann auf eine alternative Synthese des 7-Iod-Derivates **3b** erweitert werden. Hierzu wurden zunächst aus den entsprechenden Anillinen **16a** und **16b** die Monoanilide **15a** und **15b** mittels Bernsteinsäureanhydrid (**17**) hergestellt (Schema 3-12).³⁹

16a R = H **17** **15a** R = H
16b R = I **15b** R = I

Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen nach Bhusare war eine anschließende Umsetzung zu den gewünschten Produkten **3a** und **3b** jedoch nicht möglich. In beiden Fällen kam es zur Ausbildung der cyclischen Imide **18a** und **18b** (Schema 3-13, Reaktionsbedingung (i)) isoliert werden. Die bevorzugte Reaktion zu 1-Phenylpyrrolidindionen wird auch von Trujillo-Ferrara für die Umsetzung sekundärer Bernsteinsäuremonoanillide unter saurer Katalyse beschrieben.³⁹

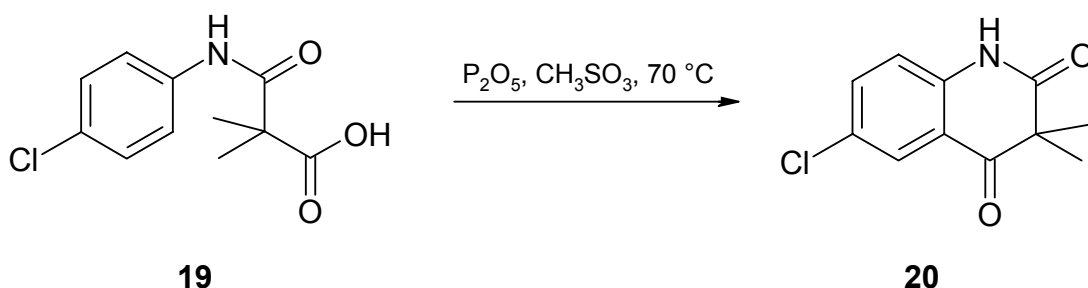
Schema 3-13: Acylierungsversuche mit Bernsteinsäuremonoanilliden **15**



Zum Schema 3-13: Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von **15a** und **15b** (i) PPA, AcOH, 95-100 °C; (ii) CH₃SO₃H, P₂O₅, 70 °C

Die Verwendung eines Methansulfonsäure-Phosphorpentoxid-Gemisches anstelle von Polyphosphorsäure bietet, aufgrund der geringeren Viskosität und verbesserter Lösungseigenschaften, oftmals Vorteile in der organischen Synthese.⁴⁰ Brundish et al. gelang auf diese Weise die Umsetzung des Dimethylalonsäuremonoamids **19** zum 6-Chlor-3,3-dimethylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**20**) in einer intramolekularen Friedel-Crafts-Acylierung,⁴¹ analog der von Bhusare postulierten Methode (Schema 3-14).

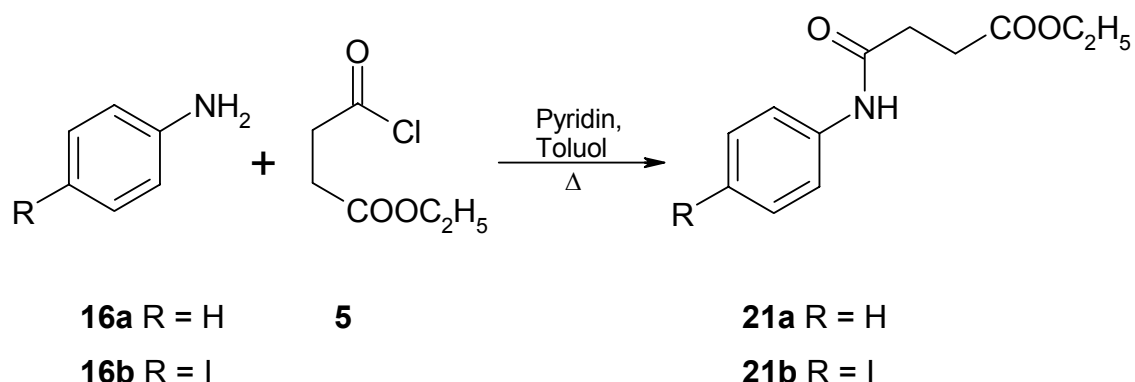
Schema 3-14: Intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung nach Brundish⁴¹



Auch unter den Bedingungen nach Brundish kam es bei der Umsetzung der Bernsteinsäuremonoamide **15** stets zur Ausbildung der Imide **18** (siehe Schema 3-13, Reaktionsbedingung (ii)).

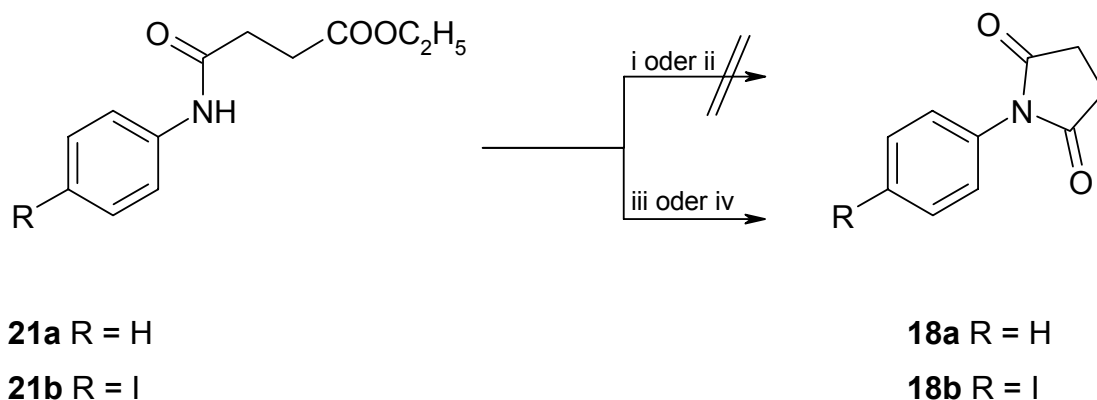
Nach Van Heerden ist eine intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung auch aus der Esterform unter Einsatz einer Lewis-Säure möglich.⁴² Hierzu wurden zunächst, wie bei Darstellung der Amide **6** (vergl. Schema 3-1), die Bernsteinsäuremonoamidethylester **21a** und **21b** aus den Anilinen **16** erschlossen (Schema 3-15).

Schema 3-15: Synthese der Bernsteinsäuremonoamidethylester **21a** und **21b**



Unter Verwendung von Aluminium(III)chlorid als Katalysator konnte für die Ester **21** keine Reaktion beobachtet werden, während sie mit Polyphosphorsäure und dem Methansulfonsäure-Phosphorpentoxid-Gemisch ebenfalls zu den 1-Phenylpyrrolidindionen **18** reagierten (Schema 3-16).

Schema 3-16: Acylierungsversuche mit den Estern **21a** und **21b**

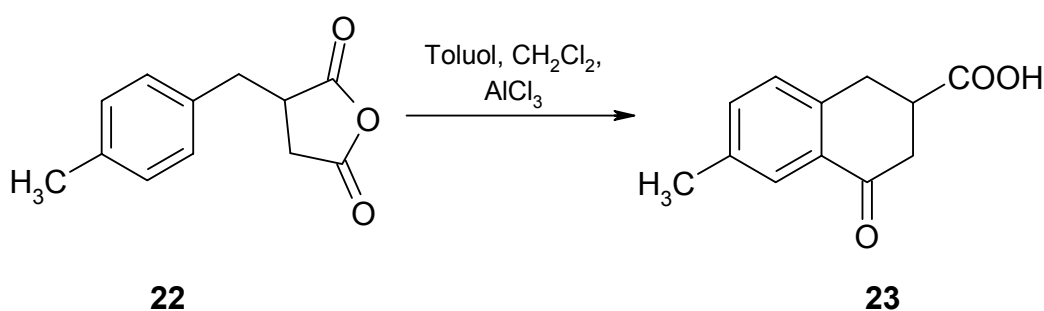


Tab. 3-4: Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von **21a** und **21b**

(i)	AlCl ₃ , Dichlormethan, reflux
(ii)	AlCl ₃ , Dichlormethan, Mikrowellen, 150 W
(iii)	PPA, AcOH, 95-100 °C
(iv)	CH ₃ SO ₃ H, P ₂ O ₅ , 70 °C

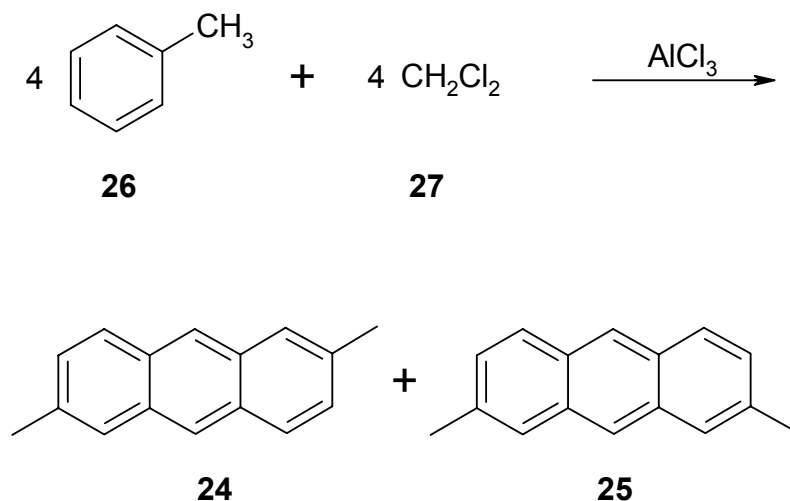
Bei dem Versuch, die Reaktionsbedingungen von Van Heerden auf das Bernsteinsäuremonoanilid **15a** zu übertragen, wurde nach einer Vorschrift von Noghuchi et al.⁴³ das Edukt in Toluol gelöst und zu einer eisgekühlten Lösung von Aluminium(III)chlorid hinzuge tropft. Noghuchi erhielt auf diese Weise aus dem Säureanhydrid **22** die Tetrahydronaphthalsäure **23** (Schema 3-17).

Schema 3-17: Friedel-Crafts-Acylierung nach Noghuchi⁴³ in Toluol und Dichlormethan



Bei der Reaktion mit **15a** als Edukt war nach kurzer Zeit eine Verfärbung des Ansatzes und ein stark fluoreszierender Fleck bei der dünnschichtchromatographischen Reaktionskontrolle zu beobachten. Nach Auswertung der ¹HNMR-Daten des isolierten Reaktionsproduktes handelte es sich hierbei um ein Gemisch des 2,6- und 2,7- Dimethylanthracens (**24**) und (**25**) im Verhältnis von 3:2, welches aus der Reaktion der Lösungsmittel durch eine Friedel-Crafts-Alkylierung entstanden war (Schema 3-18).^{44, 45, 46}

Schema 3-18: Nebenreaktion der Lösungsmittel Toluol und Dichlormethan zum 2,6- und 2,7- Dimethylantracen **24** und **25**

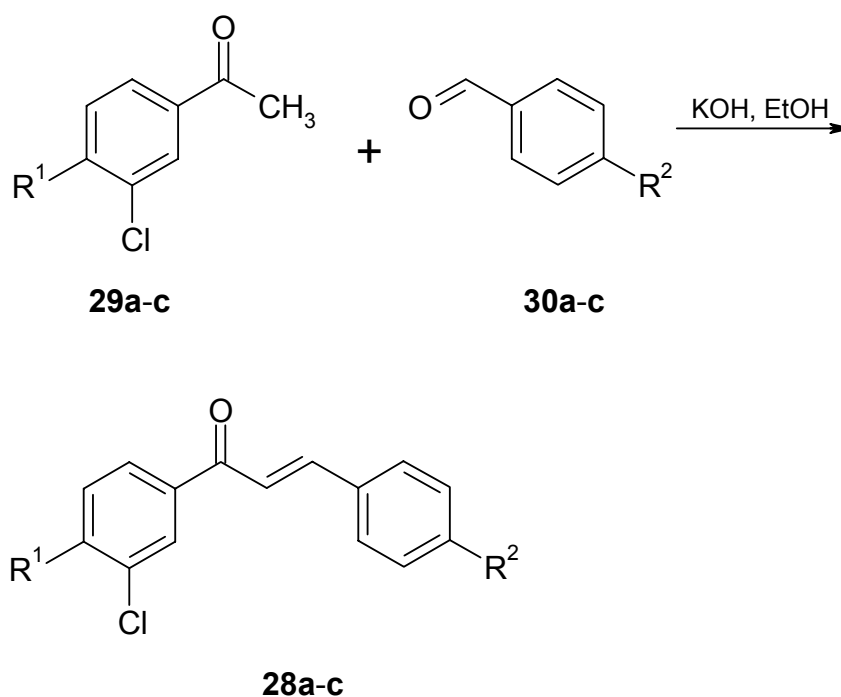


Die Methode nach Bhusare zur Darstellung von 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dionen **3** konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht nachvollzogen werden. Sowohl die widersprüchlichen analytischen Daten in der Literatur als auch die Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen geben keinen konkreten Hinweis darauf, dass eine intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung von Bernsteinsäuremonoanilidderivaten zu den gewünschten Zielstrukturen **3** führt.

3.2 Synthese von (2*E*)-Diphenyl-prop-2-en-1-onen

(2*E*)-Diphenyl-prop-2-en-1-one **28** (Chalkone) bilden neben den 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dionen **3** die zweite Komponente für die Synthese der Darpone.⁸ Für die Derivatisierung der Darpon-Leitstruktur war die Erschließung von drei unterschiedlich substituierten Chalkonen **28a-c** notwendig. Diese wurden nach dem allgemeinen Reaktionsschema 3-19 in einer basisch katalysierten Aldolkondensation aus den Acetophenonkomponenten **29** und den Benzaldehyden **30** dargestellt.

Schema 3-19: Darstellung der Chalkone durch Aldolkondensation

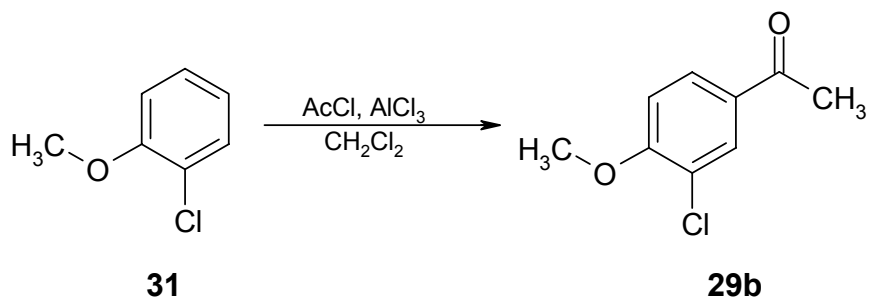


Tab. 3-5:

	R^1	R^2
28a-30a	H	-OCH ₃
28b-30b	-OCH ₃	H
28c-30c	H	H

Das nicht kommerziell erhältliche 3-Chlor-4-methoxy-acetophenon (**29b**) wurde nach Watanabe mittels Friedel-Crafts-Acylierung aus 1-Chlor-2-methoxybenzen (**31**) synthetisiert (Schema 3-20).⁴⁷

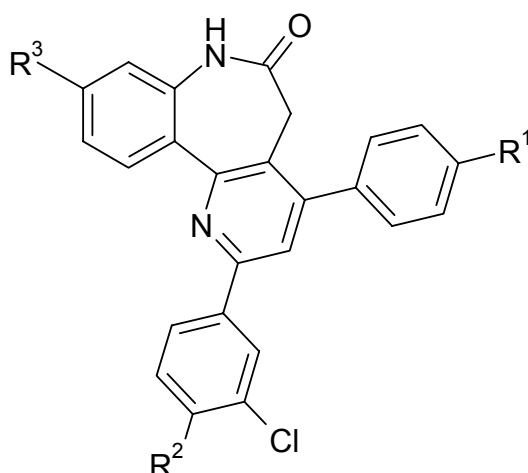
Schema 3-20: Darstellung von 3-Chlor-4-methoxy-acetophenon (**29b**)



3.3 Synthese von Darponderivaten zur Anknüpfung von Seitenketten

3.3.1 Synthese von Hydroxydarponen

Die Hydroxydarpone **32** sollten als Ausgangsverbindungen für die Anknüpfung von Seitenketten mittels der Williamson-Ethersynthese dienen. Die geplanten Anknüpfungsstellen befanden sich in den para-Positionen des 2- und des 4-Arylrestes, sowie in der 9-Position des Pyrido[3,2-*d*][1]benzazepinon-Grundgerüsts.



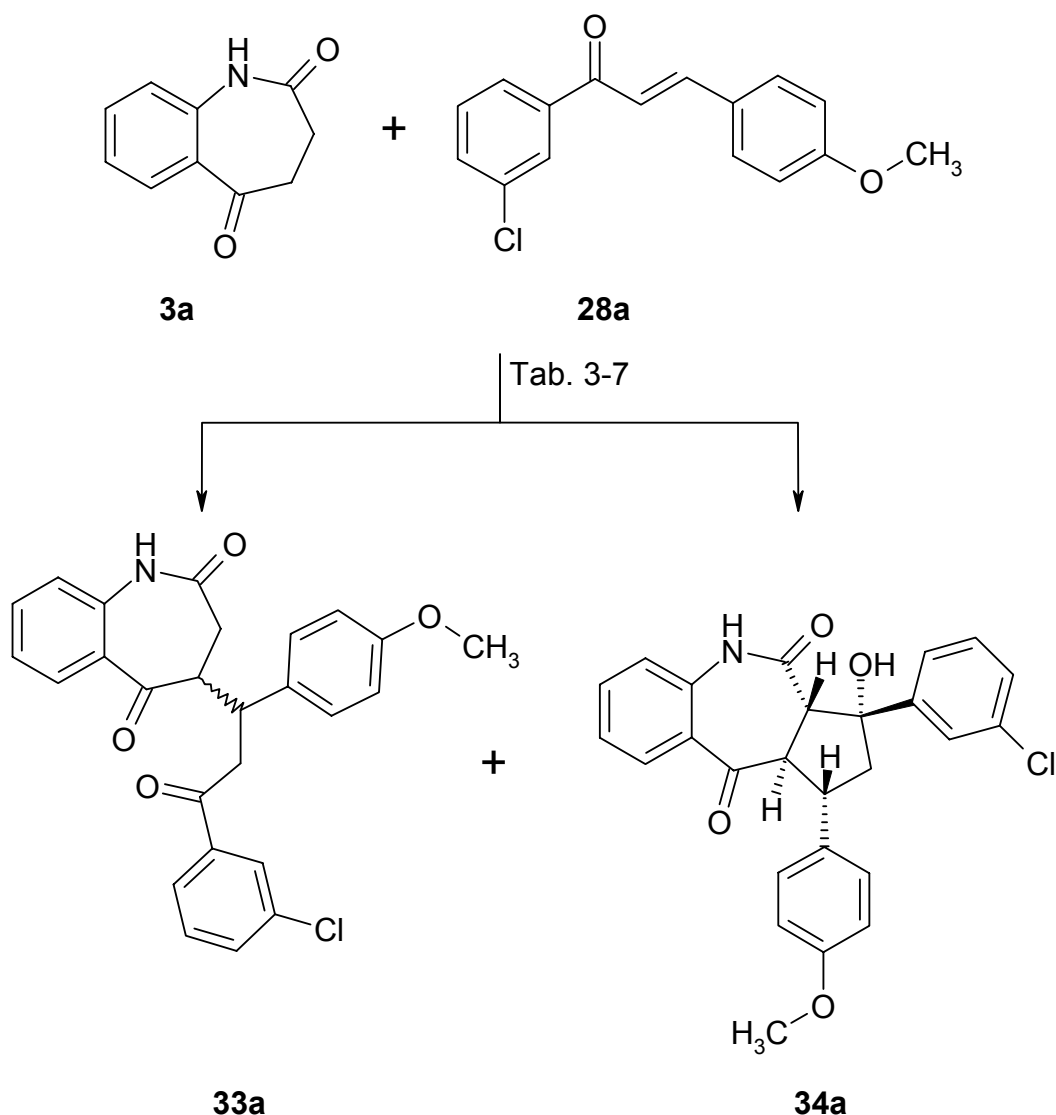
Tab. 3-6:

	R ¹	R ²	R ³
32a	OH	H	H
32b	H	OH	H
32c	H	H	OH

Das Verfahren zur Darstellung von Hydroxydarponen nach der Methode von Kunick und Link⁸ sollte zunächst am Beispiel des 2-(3-Chlorphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-ons (**32a**) erprobt werden.

Die Synthese von **32a** erfolgte ausgehend vom 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion **3a** mit dem 3'-Chlor-4-methoxychalkon **28a**. In dieser *Michael*-Addition erhielt man bei der Verwendung von 0,1 Äquivalenten Kaliumhydroxid jedoch ein Produktgemisch, welches neben dem gewünschten *Michael*-Addukt **33a** die tricyclische Verbindung **34a** als Hauptkomponente enthielt (Schema 3-21 und Tabelle 3-7 Versuch (iii)).

Schema 3-21: *Michael*-Addition des Chalkons **28a** an das Benzazepinon **3a**



Die bevorzugte Entstehung von Benzo[*b*]cyclopenta[*e*]azepindionen **34a** wurde von Kunick et al. bei Verwendung äquimolarer Mengen von Kaliumhydroxid für diese Reaktion beschrieben.²⁶ Dabei kommt es zu einer Aldol-Addition im

Anschluß an die gewünschte *Michael*-Addition. Bleeker beschrieb die Einflüsse der Phenylsubstituenten des Chalkons auf das Produktverhältnis in Abhängigkeit von unterschiedlichen Basen.⁴⁸

Zur Optimierung der Reaktion wurden im Folgenden Versuche mit verschiedenen basischen Katalysatoren durchgeführt. Die Edukte wurden mit 0,1 Äquivalenten Kalium-, Litium-, Natrium- oder Calciumhydroxid bei Raumtemperatur in Ethanol gerührt, bis sie in der dünnschicht-chromatographischen Kontrolle nicht mehr nachweisbar waren. Nach Neutralisation mit Essigsäure wurde der Ansatz auf Wasser gegeben und dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingeeengt und der Rückstand ¹H-NMR-spektroskopisch vermessen. Für die Auswertung wurden die prozentualen Anteile der NH-Signale von **33a** und **34a** im Verhältnis zur Gesamtintensität der NH-Signale des Spektrums errechnet. Die Versuchsbedingungen und Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 wiedergegeben.

Tab. 3-7: Ergebnisse der Reaktionen zu Schema 3-21

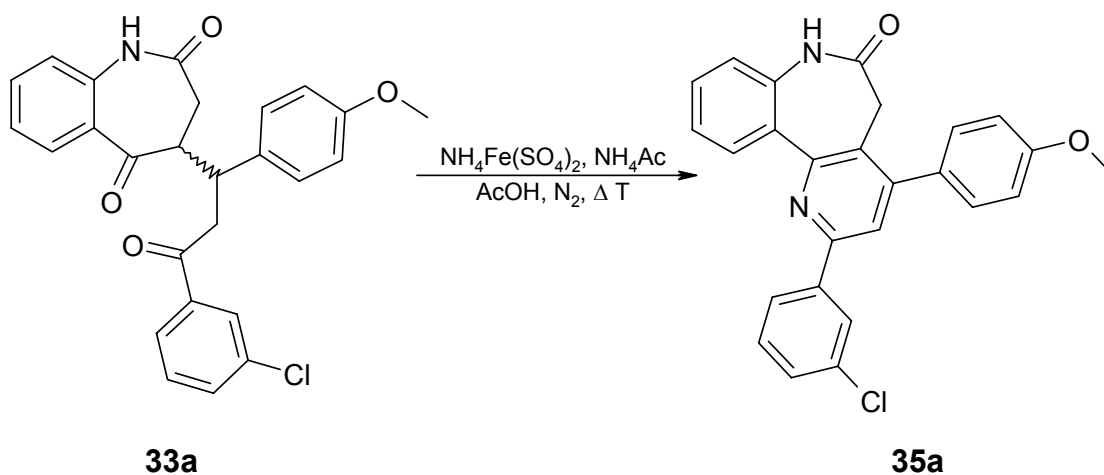
Versuch	Base	Reaktionszeit (h)	<i>Michael</i> -Addukt ^a	Cyclopentanol ^a
	(0,1 Äq.)		33a	34a
(i)	LiOH	2	73 %	14 %
(ii)	NaOH	4	73 %	16%
(iii)	KOH	3	16 %	81 %
(iv)	Ca(OH) ₂	24	38 %	15 %

^a Prozentualer Anteil, errechnet aus der Gesamtintensität der NH-Signale des ¹H-NMR-Spektrums

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde bei den folgenden Synthesen Lithiumhydroxid verwendet, wodurch das *Michael*-Addukt **33a** in moderaten Ausbeuten von 57% erhalten werden konnte.

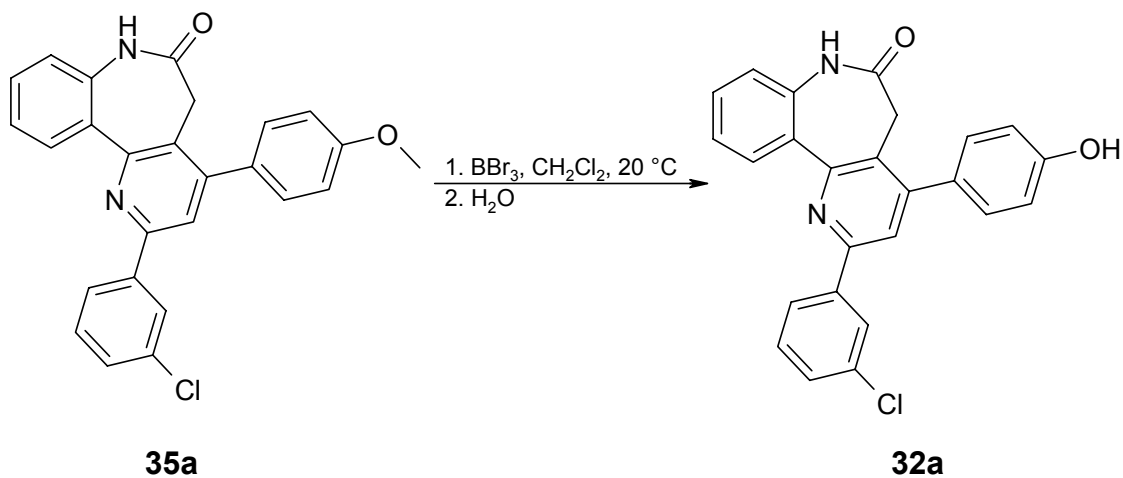
Im nächsten Schritt erfolgte der oxidative Ringschluss von **33a** durch Erhitzen mit Ammoniumacetat in Gegenwart von Ammoniumeisen(III)sulfat in ebenfalls guter Ausbeute (82%) zum Pyrido[3,2-*d*][1]benzazepinon **35a** (Schema 3-22).

Schema 3-22: Pyridinringschluss zum Methoxydarpon **35a**



Die Etherspaltung des methoxysubstituierten Darpons **35a** zur gewünschten Hydroxyverbindung **32a** erfolgte nach Wieking³¹ mittels Bortribromid, analog einer von McOmie⁴⁹ beschriebenen Methode (Schema 3-23).

Schema 3-23: Darstellung des Hydroxydarpons **32a** durch Etherspaltung



Eine direkte Umsetzung eines Hydroxychalkons mit dem Benzazepinon **3a** wäre eine denkbare Alternative zum Syntheseweg über die Etherspaltung gewesen. Jedoch zeigten Untersuchungen von Link, dass eine basen-katalysierte *Michael*-Addition für diesen Reaktionsschritt nicht möglich ist.⁵⁰

Die Synthese des 2-(3-Chlorphenyl-4-hydroxy)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-ons (**32b**) sollte in analoger Weise zu **32a** erfolgen. Auch hier wurden, aufgrund der bekannten Probleme bei der *Michael*-Addition, Untersuchungen bezüglich der Produktverhältnisse von *Michael*-Addukt zum Cyclopentanol durchgeführt. Wie anhand der Tabelle 3-8 zu erkennen ist, war die Bildung des gewünschten Produkts **33b** für alle Basen in der Konzentration von 0,1 Äquivalenten bevorzugt. Die Darstellung von **33b** erfolgte somit unter Verwendung von Kaliumhydroxid in Ethanol (Schema 3-24).

Tab. 3-8: Ergebnisse der Reaktionen zu Schema 3-24

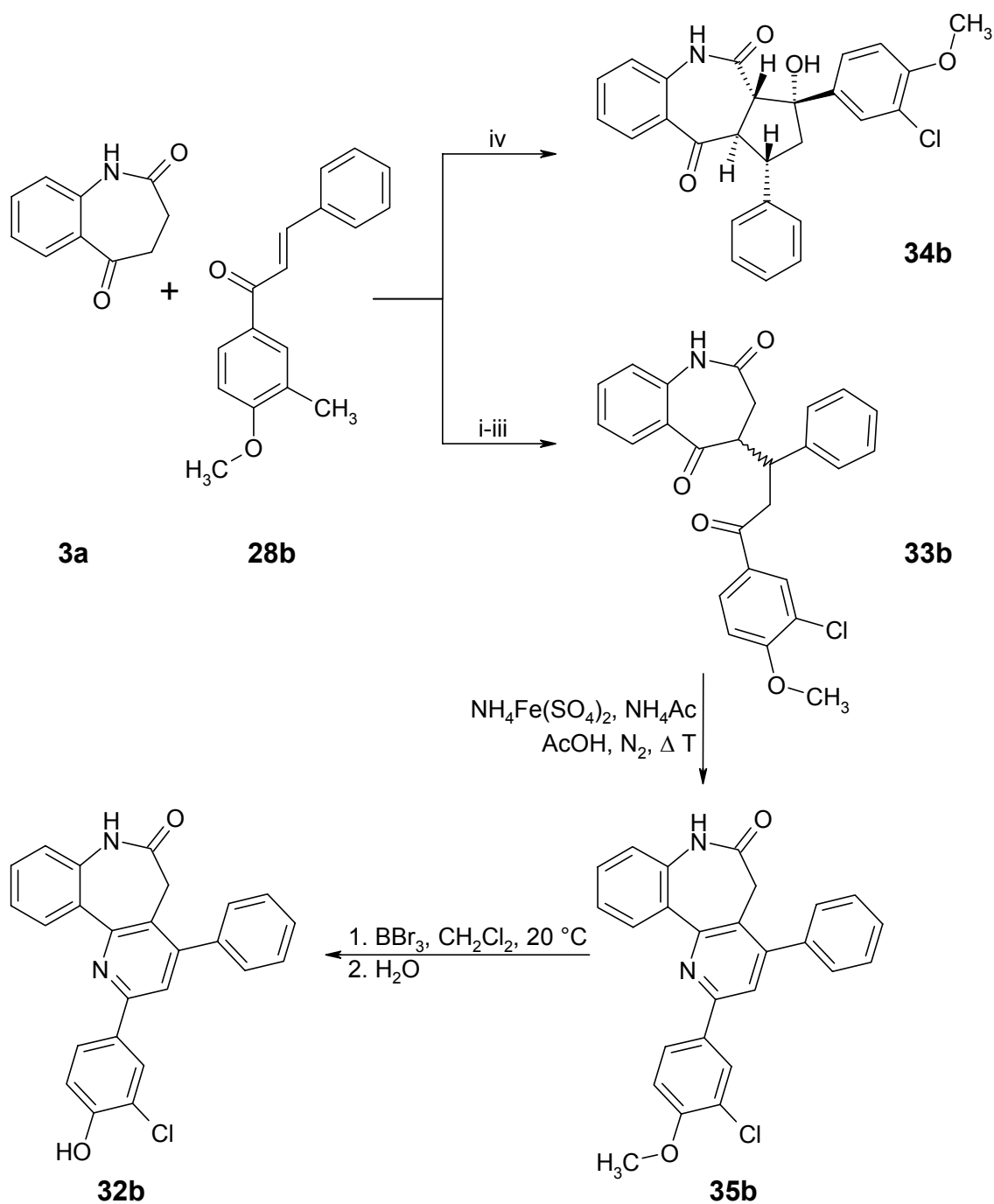
Versuch	Base (0,1 Äq.)	Reaktionszeit (h)	<i>Michael</i> -Addukt ^a 33b	Cyclopentanol ^a 34b
(i)	LiOH	30	72 %	2 %
(ii)	NaOH	30	87 %	3 %
(iii)	KOH	24	85 %	2 %
(iv)	KOH (1 Äq.)	24	6 %	79 %

^a Prozentualer Anteil, errechnet aus der Gesamtintensität der NH-Signale des ¹H-NMR-Spektrums

Diese Ergebnisse deckten sich mit den Beobachtung, die Bleeker für die *Michael*-Addition mit Chalkonen beschrieben hat, die am 1-Phenylrest einen Substituenten mit +M-Effekt aufweisen. Durch diesen kann eine mesomere Grenzstruktur zu **33b** formuliert werden, in der die Carbonylfunktion als Enolat vorliegt und somit den nukleophilen Angriff des Carbanions der Lactamfunktion am Carbonylkohlenstoff verhindert. Lediglich bei einer Erhöhung der Katalysatormenge auf 1 Äquivalent kam es in Versuch (iv) zur Ausbildung des Benzo[*b*]cyclopenta[*e*]azepindions **34b**. Die Synthesesequenz über die *Michael*-

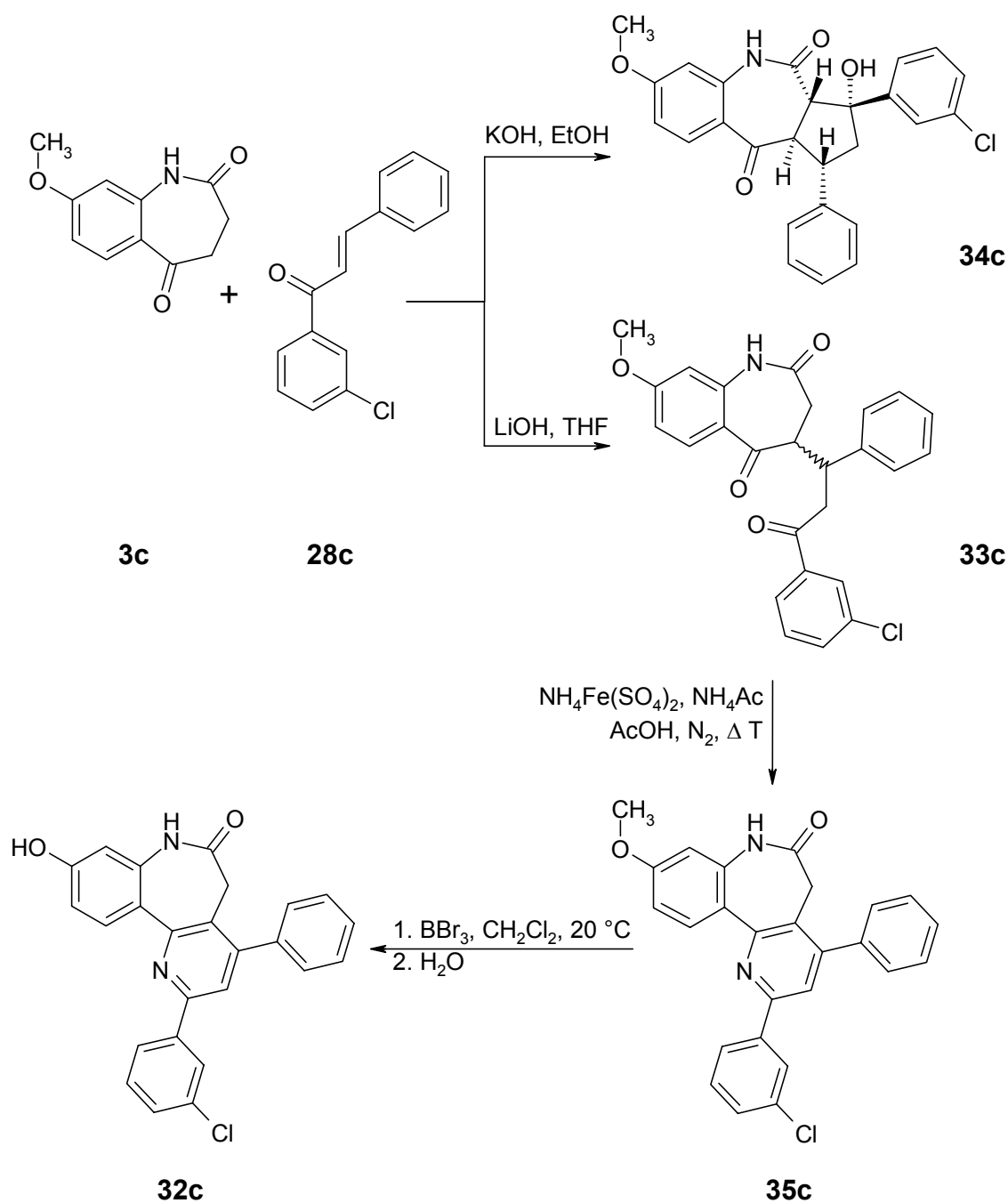
Addition, Cyclisierung und Etherspaltung von **35b** zum Hydroxydarpon **32b** ist in Schema 3-24 dargestellt. Die Reaktionen ergaben die jeweiligen Zwischenstufen in moderaten Ausbeuten.

Schema 3-24: Synthesesequenz zum Hydroxydarpon **32b**



Die *Michael*-Addition von Benzazepinon **3c** an das Chalkon **28c** mit Kaliumhydroxid in Ethanol lieferte quantitativ das Cyclopentanol **34c**. Dagegen wurde mit 0,1 Äquivalenten Lithiumhydroxid in THF das gewünschte Addukt **33c** in einer Ausbeute von 81% erhalten. Die weiteren Schritte zum Hydroxydarpon **32c** erfolgten analog zu den Synthesen von **32a** und **32b** (Schema 3-25).

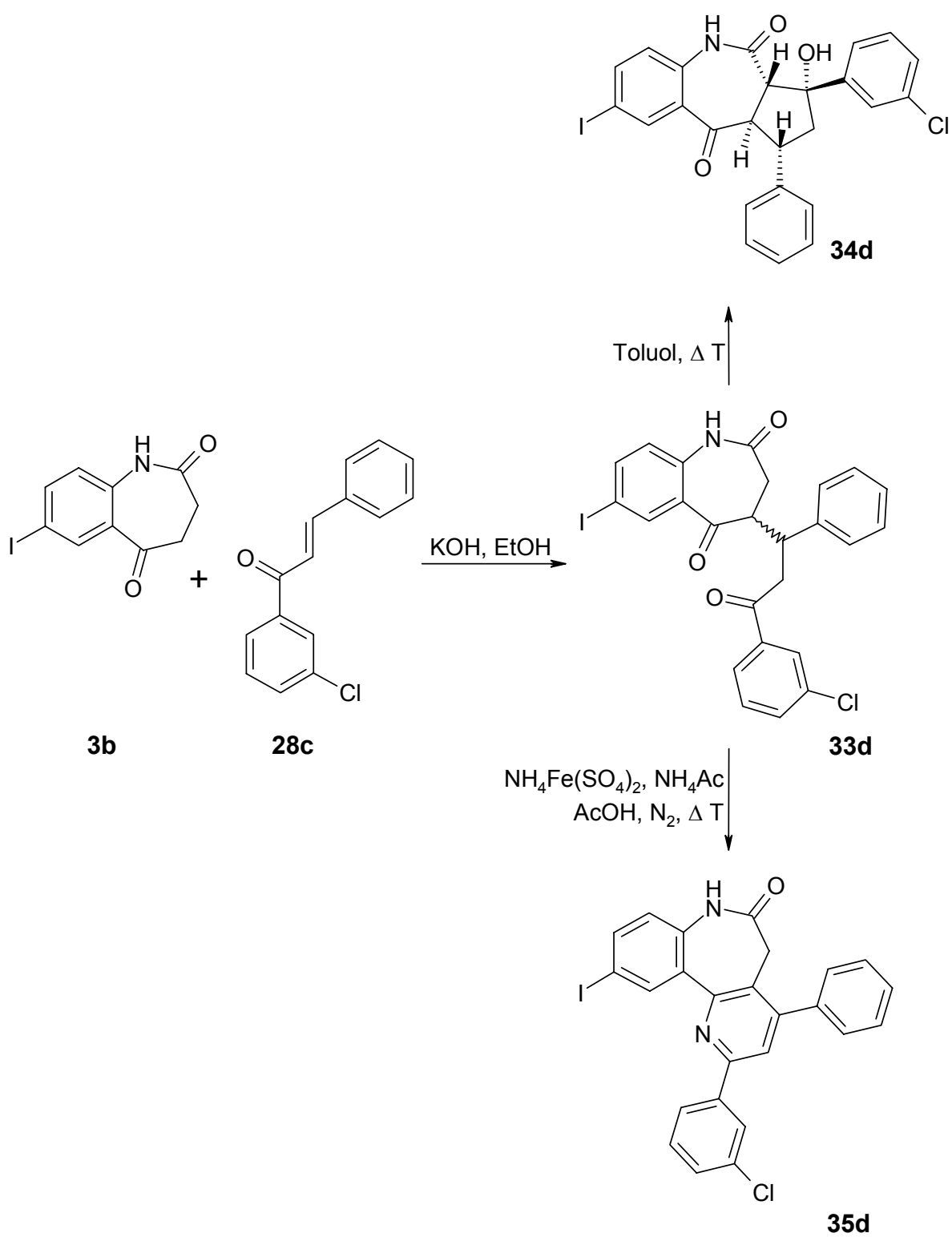
Schema 3-25: Synthesesequenz zum Hydroxydarpon **32c**



3.3.2 Synthese des 10-Iod-2-(3-chlorphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-ons

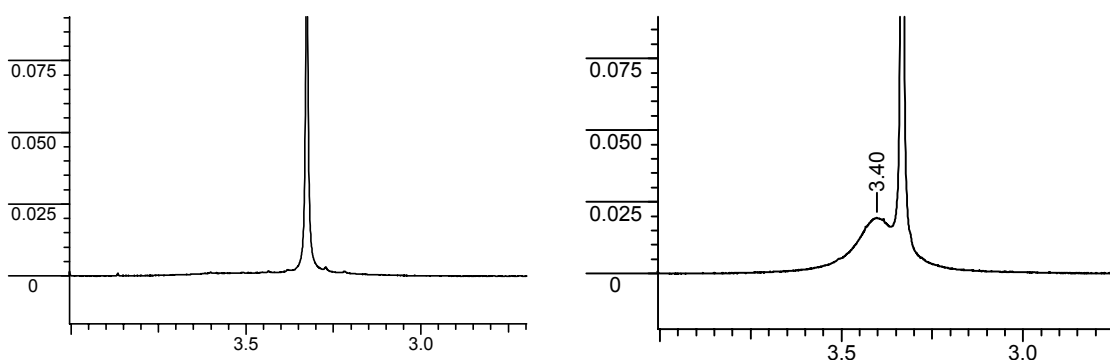
Für die Synthese Kohlenstoff-verknüpfter Darponderivate sollte das 10-Iod-2-(3-chlorphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**35d**) als Edukt dienen.

Ausgehend vom 7-Iodbenzazepindion **3b** und dem Chalkon **28c** erfolgte unter Katalyse von 0,1 Äquivalenten Kaliumhydroxid in Ethanol eine quantitative Umsetzung zum *Michael*-Addukt **33d**, ohne dass im Reaktionsverlauf die Bildung des cyclopentan-anellierten Nebenproduktes **34d** im Dünnschichtchromatogramm sichtbar wurde. Anhand von ¹H-NMR-spektroskopischen Daten konnte gezeigt werden, dass es trotz Neutralisation des Reaktionsansatzes bei dem Umkristallisationsprozess reproduzierbar zur Entstehung von **34d** kam. Die Cyclisierung mit Ammoniumeisen(III)sulfat zum Ioddarpon (**35d**) erfolgte daher aus dem unaufgereinigten Rohprodukt **33d**. Die Reaktionen sind in Schema 3-26 zusammengefasst.



Im ^1H -NMR-Spektrum der Darpone wird ersichtlich, dass die Azepinpartialstruktur einer schnellen Ringinversion unterliegt, infolge derer die geminalen Methylprotonen als ein koaleszierendes Signal erscheinen. Dieses Phänomen wurde bereits von Link⁵⁰ beschrieben und konnte für alle in dieser Arbeit dargestellten Darpone bestätigt werden. Die azepinischen Methylprotonen erscheinen stets als ein stark verbreitertes Signal, welches nur anhand der Integrationsfläche im Bereich von ca. 3.00 bis 4.00 ppm, überlappend mit dem Signal des Wassers, zu erkennen ist. Im Unterschied dazu erscheinen die azepinischen Protonen der Verbindung **35d** im ^1H NMR-Spektrum deutlich als breites Singulett (s. Abbildung 3-4).

Abb. 3-4: ^1H -NMR-Signale der azepinischen Protonen von **35a** und **35d**



^1H -NMR-Signale der azepinischen Protonen von Darpon **35a** und **35d**. Links: Darpon **35a**, stark verbreitertes, kaumsichbares Signal von 3.2 -4.0 ppm. Rechts: Darpon **35d**, mit sichtbarem Singulett bei 3.40 ppm. Bei 3.33 ppm erscheint jeweils der überlappende Wasserpeak.

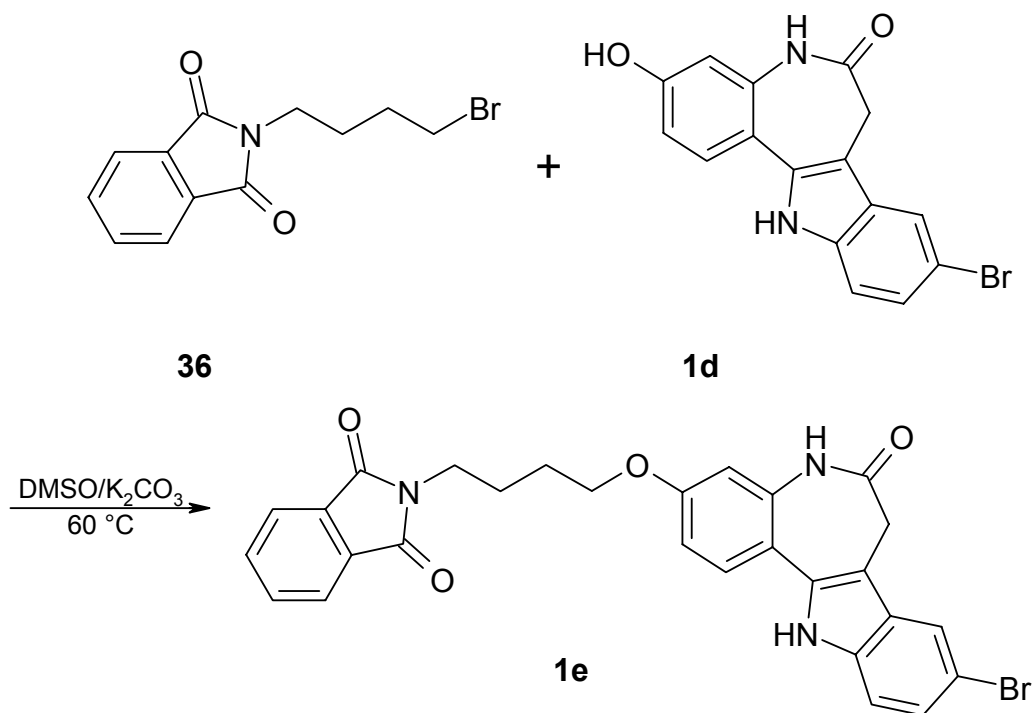
Dieser Effekt spiegelt sich ebenfalls in der Beobachtung wieder, dass für **35d** im ^{13}C -DEPT-Spektrum der azepinische C(6)-Kohlenstoff sichtbar ist, während er bei den Darponen **35a-c** in der Regel nur im hoch aufgelöstem ^1H -breitbandentkoppeltem Spektrum als schwaches Signal bei ca. 35 ppm zu detektieren ist.

3.4 Synthese von Aminobutoxydarponen

3.4.1 Darstellung von Darponen mit primären Aminogruppen

Die Darstellung von Darponen mit aminogruppenhaltigen Seitenketten war über die Veretherung der Hydroxydarponderivate **32a-c** mit *N*-(4-Brombutyl)phthalimid (**36**) geplant. Diese Reaktion wurde von Wieking³¹ für die Anknüpfung von **36** an das 3-Hydroxy-Kenpaullon **1d** beschrieben, welche in Gegenwart von Kaliumcarbonat in DMSO durchgeführt wurde (Schema 3-27).

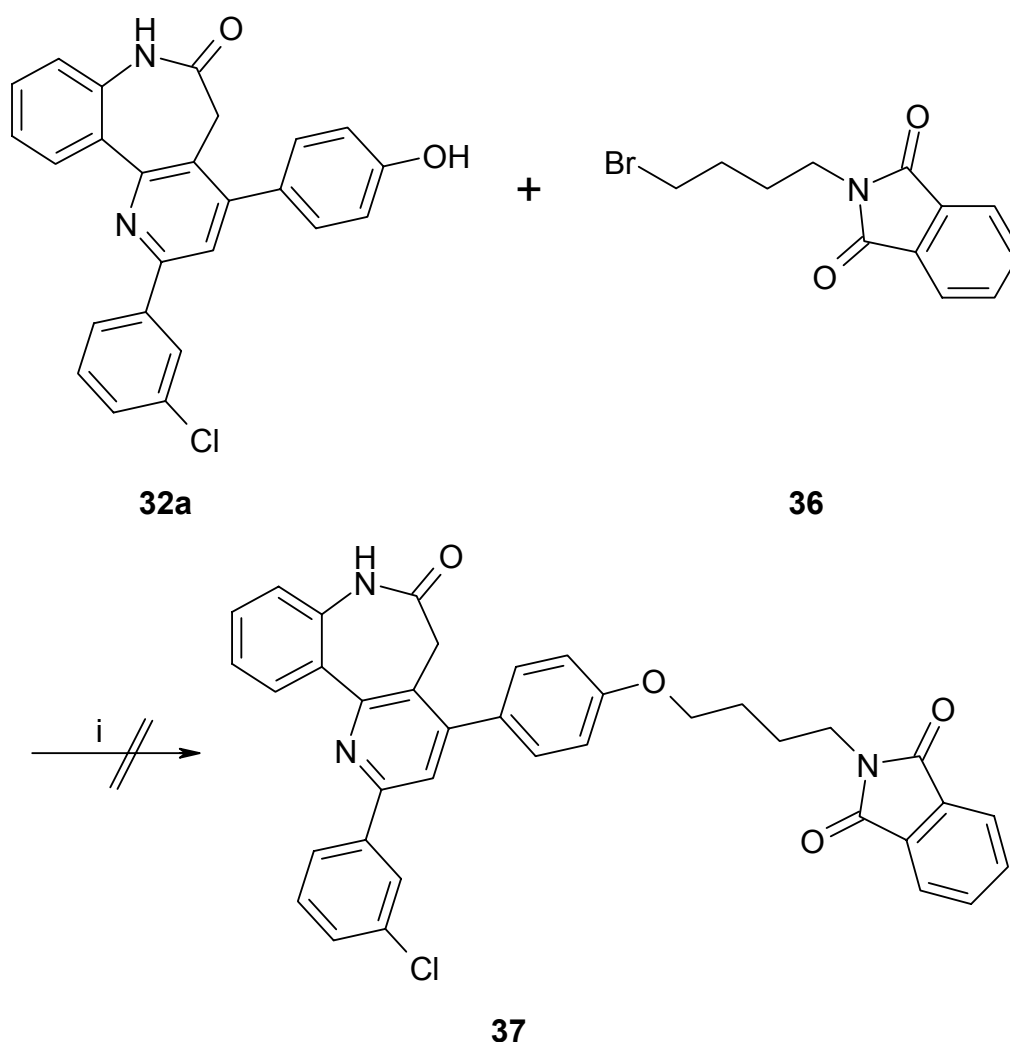
Schema 3-27: Veretherung von 2-Hydroxy-Kenpaullon **1d**



Eine Übertragung der Reaktionsbedingungen auf die Hydroxydarpone **32a-c** konnte jedoch nicht in befriedigenden Ausbeuten realisiert werden. Die dünnschichtchromatographische Analyse ließ vermuten, dass es neben der gewünschten Veretherung an der phenolischen Gruppe zur Zweitsubstitution am Lactamstickstoff gekommen war. Zur Optimierung der Reaktion wurden für

Verbindung **32a** verschiedene basische Katalysatoren, Lösungsmittel und Reaktionsbedingungen getestet, die jedoch alle keine zufrieden stellenden Ausbeuten hervorbrachten (Schema 3-28). Bei schleppender Umsetzung konnte im Dünnschichtchromatogramm mit zunehmender Reaktionszeit die Entstehung eines Startflecks beobachtet werden, der auf die Hydrolyse des Phthalimids zum Anthranilsäuremonoamid hindeutete.^{33, 51} Die Erschließung der gewünschten Phthalimidverbindung **37** nach dem in Schema 3-28 aufgezeigtem Weg wurde daher nicht weiter verfolgt.

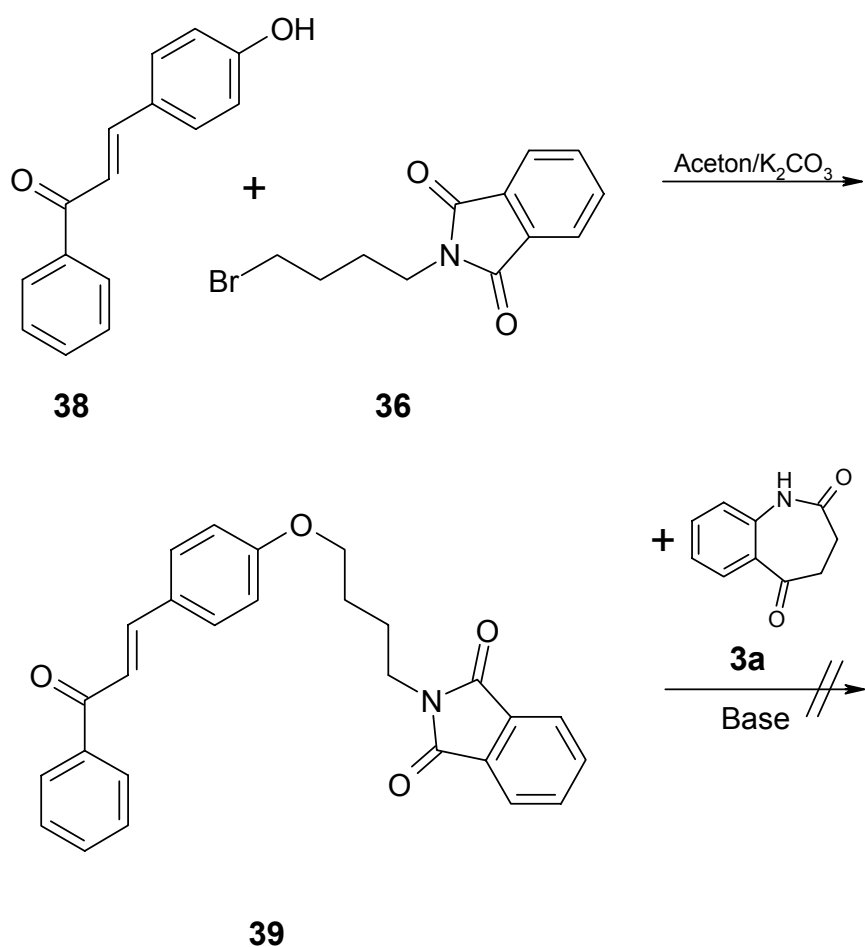
Schema 3-28: Versuche zur Darstellung des Darponphthalimids **37**



(i) Reaktionsbedingungen: K_2CO_3 / DMSO, Aceton, Acetonitril; NaH/ DMF

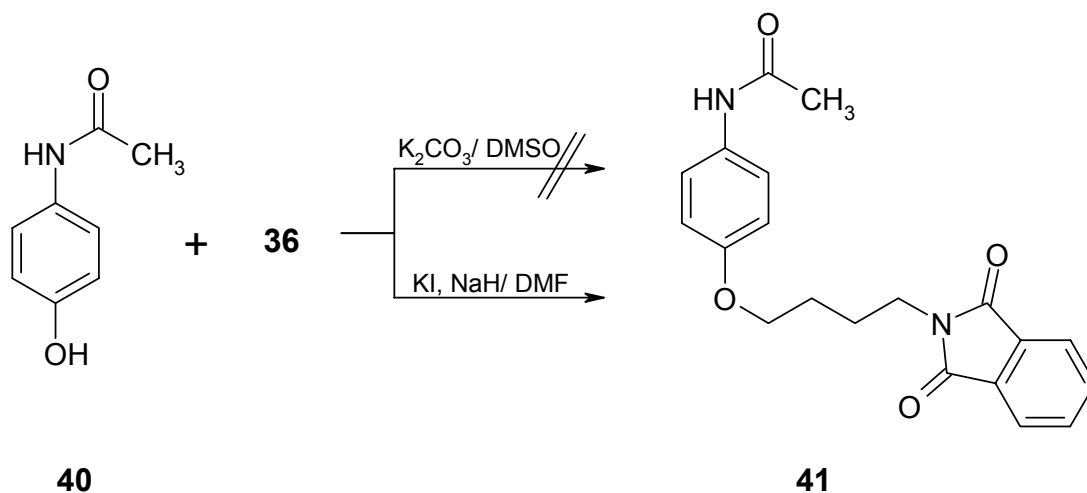
Für die alternative Darstellung der Darponphthalimidstrukturen wurde in einem Modellversuch das Hydroxychalkon **38** mit *N*-(4-Brombutylphthalimid) (**36**) zum 4-(Phthalimidobutoxy)-chalkon **39** umgesetzt, das dann mit dem Benzazepindion **3a** zum Michael-Addukt verknüpft und anschließend durch Pyridinringschluss zum Darpon reagieren sollte. Während die Veretherung von **38** mit **36** in Gegenwart von Kaliumcarbonat in Aceton gute Ausbeuten lieferte (71%), scheiterte die anschließende Umsetzung mit dem Benzazepinon **3a**. (Schema 3-29). Auch hier wurden unterschiedliche Bedingungen bezüglich Katalysatoren und Lösungsmitteln getestet, die jedoch alle eine Vielzahl von dünnschichtchromatographisch detektierbaren Nebenprodukten hervor brachten.

Schema 3-29: Versuch zur alternativen Darstellung von Darponphthalimiden



Für orientierende Synthesestudien sollte für die folgenden Versuche mit einer Modellverbindung gearbeitet werden, um den Verbrauch an aufwendig produzierten Edukten zu vermeiden. Hierfür erwies sich das 4-Hydroxy-acetanilid (= Paracetamol **40**) als sehr geeignet, da dieses wie die Hydroxydarphone **32a**, **32b** und **32c** eine phenolische Hydroxylgruppe aufweist und sich auch gegenüber *N*-(4-Brombutylphthalimid) (**36**) ähnlich verhält. So war die Darstellung des *N*-(4-[4-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)butoxy]phenyl)acetamids (**41**) unter Standardbedingungen der Veretherung (Kaliumcarbonat in Aceton oder DMSO) nicht möglich. Diese konnte zwar unter Verwendung von Natriumhydrid als Hilfsbase und Kaliumiodid in DMF nach einer Methode von Otzen⁵² realisiert werden, jedoch ließen sich die Bedingungen nicht auf die Reaktion des Hydroxydarpons **32a** mit **36** übertragen (Schema 3-30).

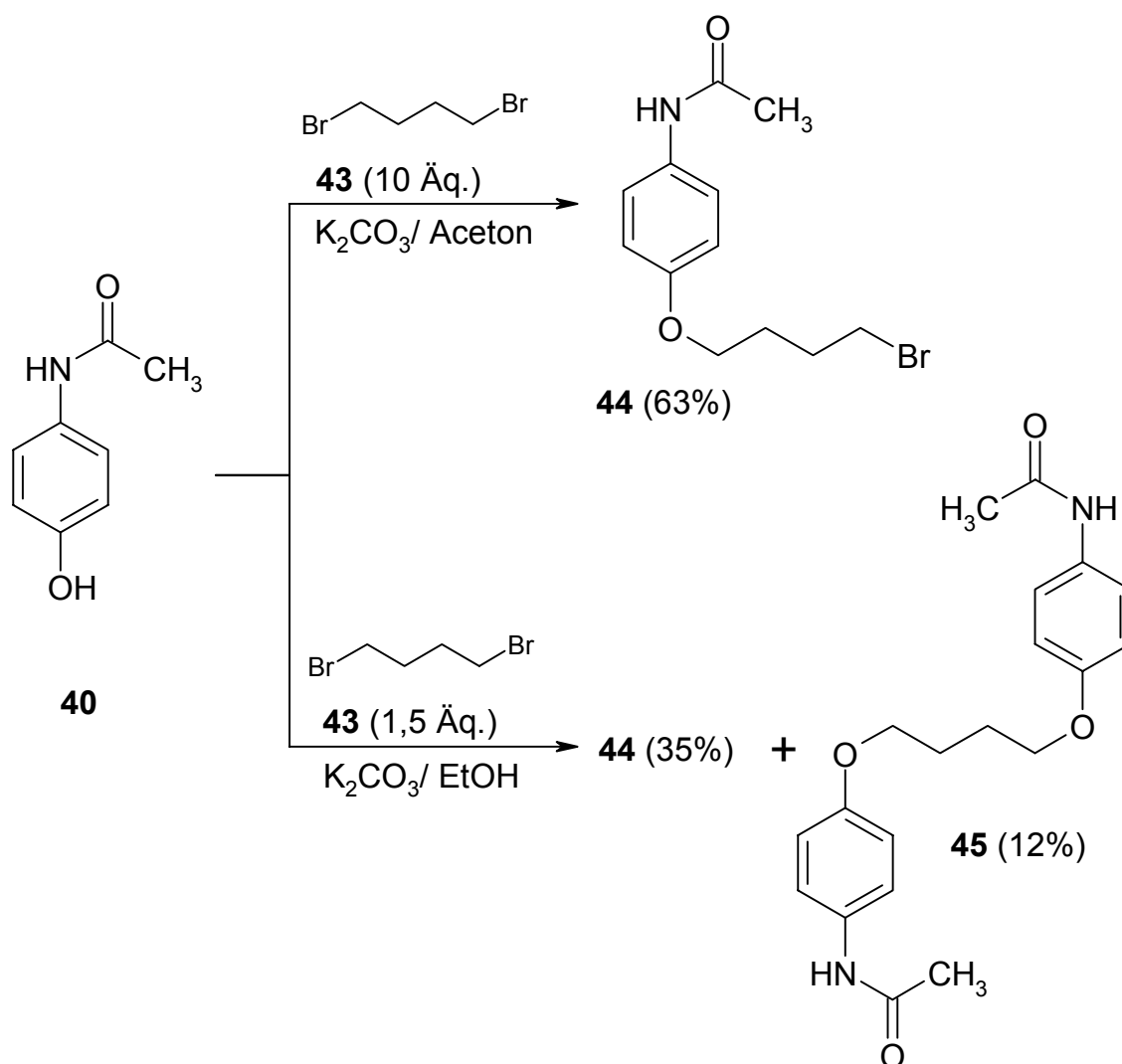
Schema 3-30: Modellversuch zur Veretherung des Paracetamols **40**



Boden et al.⁵³ beschrieb die Darstellung von etherverknüpften Phthalimiden über die Umsetzung eines *n*-Halogenalkanethers mit Kaliumphthalimid (**42**). Bei der Übertragung dieser Synthesesequenz auf die Modellschubstanz wurde zunächst das 4-Hydroxy-acetanilid (**40**) mit 1,4-Dibrombutan **43** zur

Bromalkylverbindung **44** umgewandelt. Es erwies sich als vorteilhaft, einen großen Überschuss des Alkylierungsmittels in Aceton zu verwenden, da unter den von Parrick⁵⁴ beschriebenen Bedingungen schlechte Ausbeuten resultierten, die auf die Entstehung des Diethers **45** zurückgeführt werden konnten (Schema 3-31).

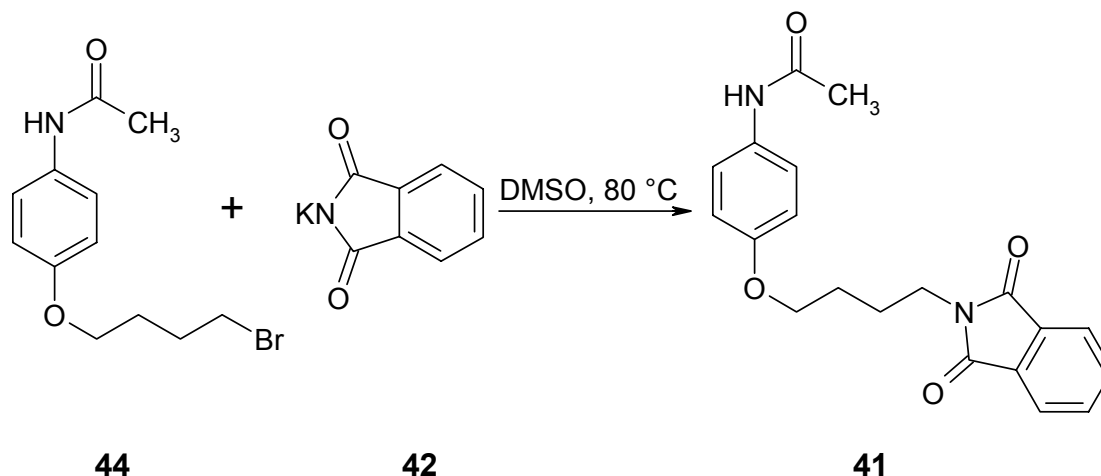
Schema 3-31: Umsetzung von Paracetamol **40** mit Dibrombutan **43**



Die Umwandlung der Brombutoxyverbindung **44** zum gewünschten Phthalimid **41** erfolgte nach Boden⁵³, wobei die Ausbeute durch Verwendung von DMSO

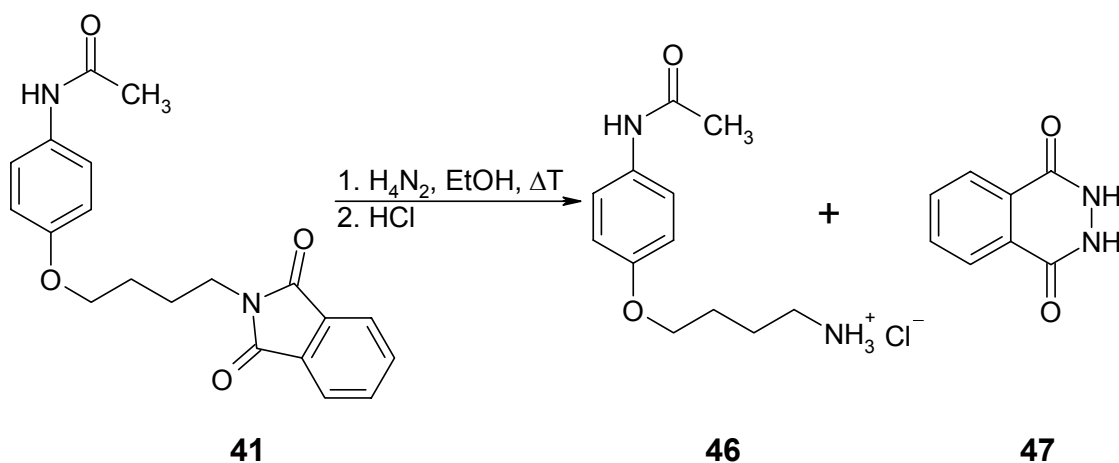
statt DMF als Lösungsmittel von 51% auf 71% gesteigert werden konnte (Schema 3-32).

Schema 3-32: Umsetzung des Bromethers **44** mit Kaliumphthalimid **42**



Die Reaktion zur primären Aminoverbindung erfolgte nach der klassischen Gabriel-Synthese unter Verwendung von Hydrazinmonohydrat. Nach Abtrennung des Phthalsäurehydrazids **47** wird durch anschließende Behandlung mit Salzsäure das Hydrochlorid **46** erhalten (Schema 3-33).

Schema 3-33: Hydrazinolyse des Phthalimids **41**



Die mit der Modellschubstanz erprobten Reaktionsbedingungen ließen sich auf die Synthesesequenz zur Darstellung der Aminobutoxydarpone **49** und deren Hydrochloride **50** übertragen. Die von den drei Hydroxydarponen **32 a,b** und **c** ausgehenden Reaktionen konnten in akzeptablen Gesamtausbeuten von 25, 58 und 20 % bezogen auf das jeweils resultierende freie Amin **49** durchgeführt werden (Schemata 3-34 bis 3-36).

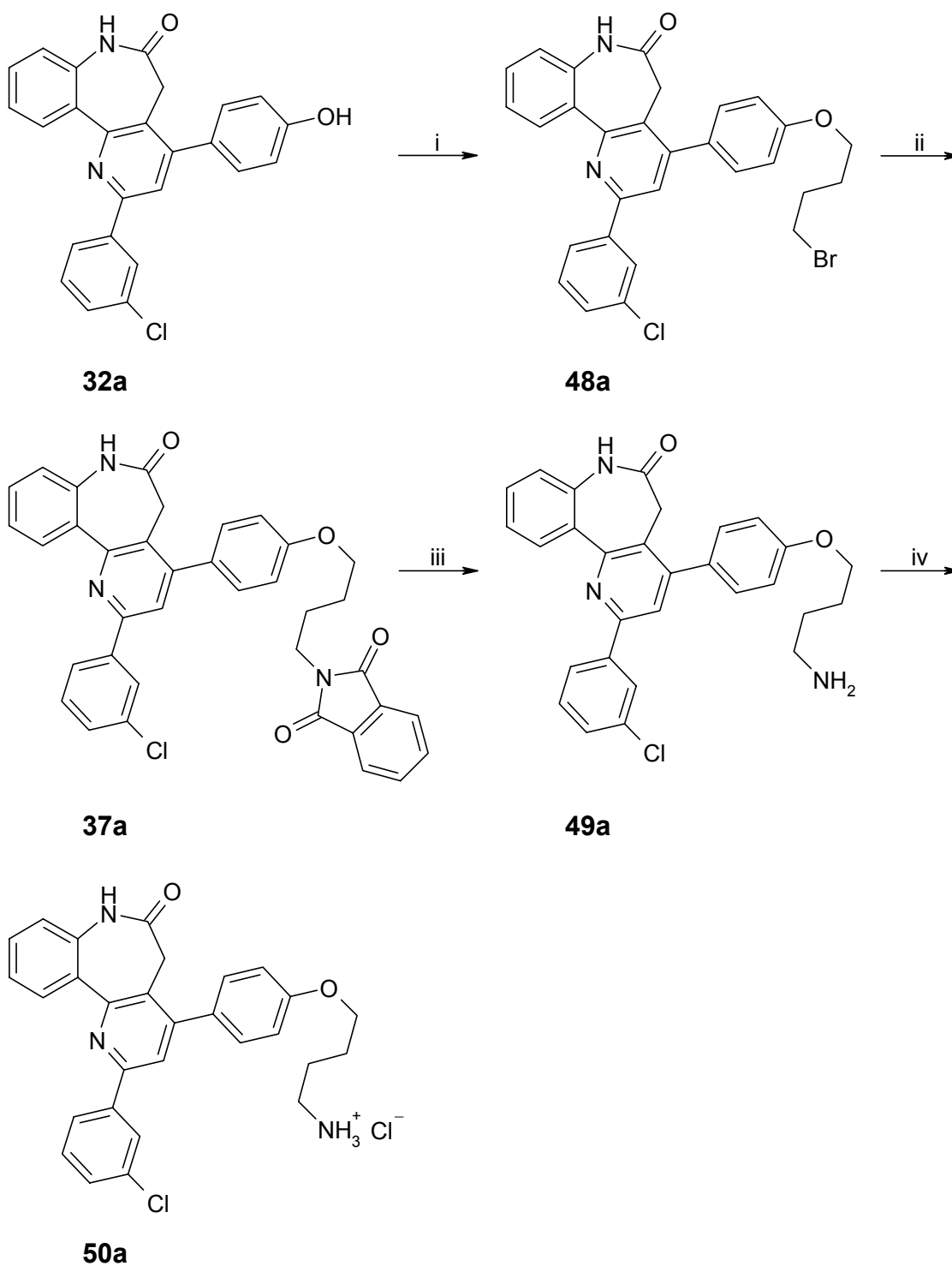
Ein wichtiger Grund für die Darstellung von Darponen mit aminogruppenhaltigen Seitenketten war die Verbesserung der Wasserlöslichkeit der unmodifizierten Darpone, wie z.B. der Leitstruktur **2B**, die sich nur in Spuren (<1 µg/mL) in Wasser löst. Zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit der Verbindungen **50a-c** wurden bei 20 °C gesättigte wässrige Lösungen hergestellt und deren Konzentration durch HPLC bestimmt. Die in Tabelle 3-9 zusammengestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche verbesserte Löslichkeit der Hydrochloride gegenüber der Leitstruktur **2B**.

Tab. 3-9: Löslichkeiten der Aminobutoxydarponhydrochloride ^a

Verbindung	50a	50b	50c
Sättigungskonzentration	0,87 mg/mL	0,43 mg/mL	0,21 mg/mL

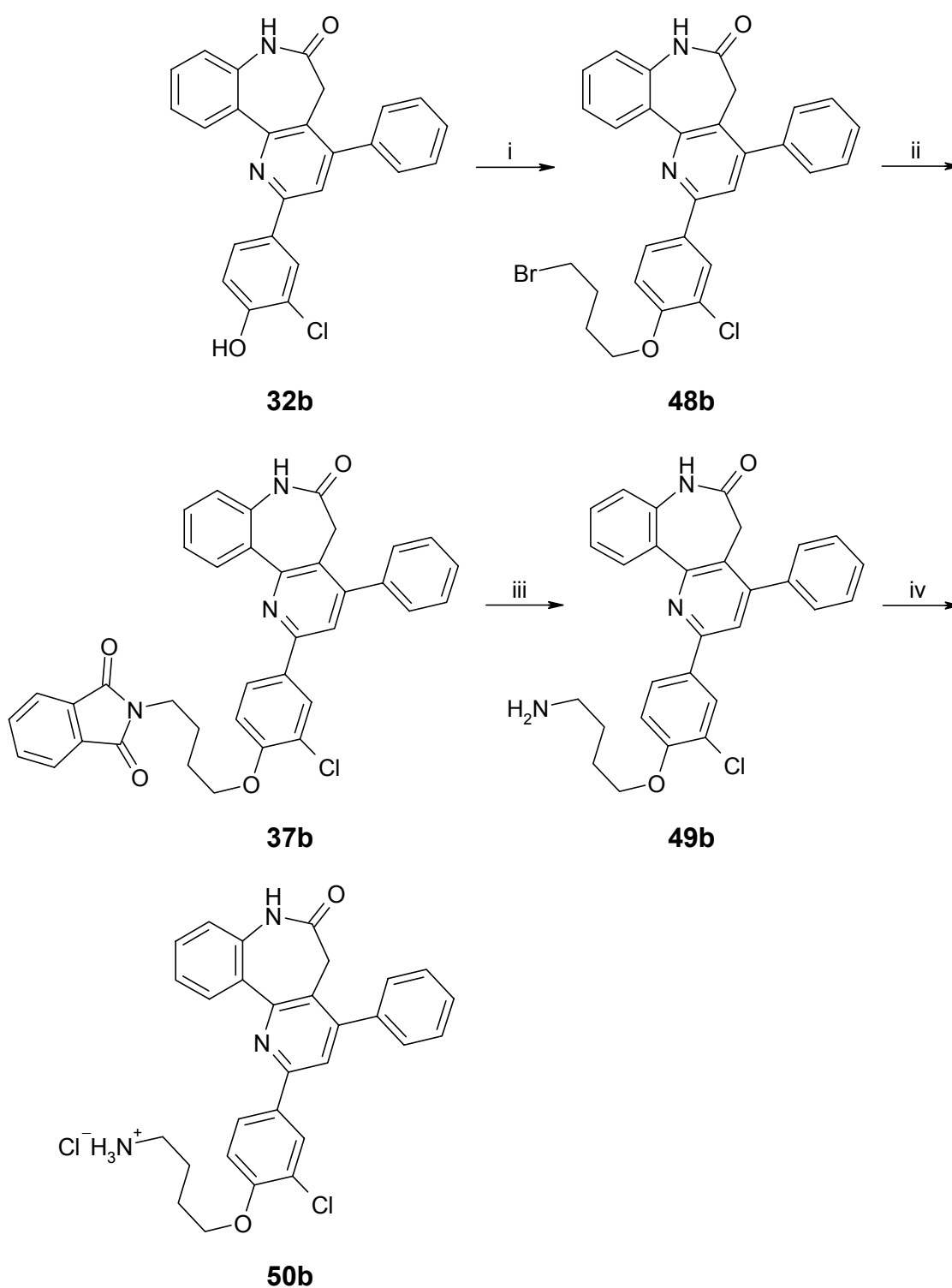
^a Lösungsmittel: demineralisiertes Wasser, Inkubationszeit 2.5 h, bei 5000 rpm 2 h zentrifugiert

Schema 3-34: Darstellung des Aminobutoxydarpon-Hydrochlorids **50a**^a



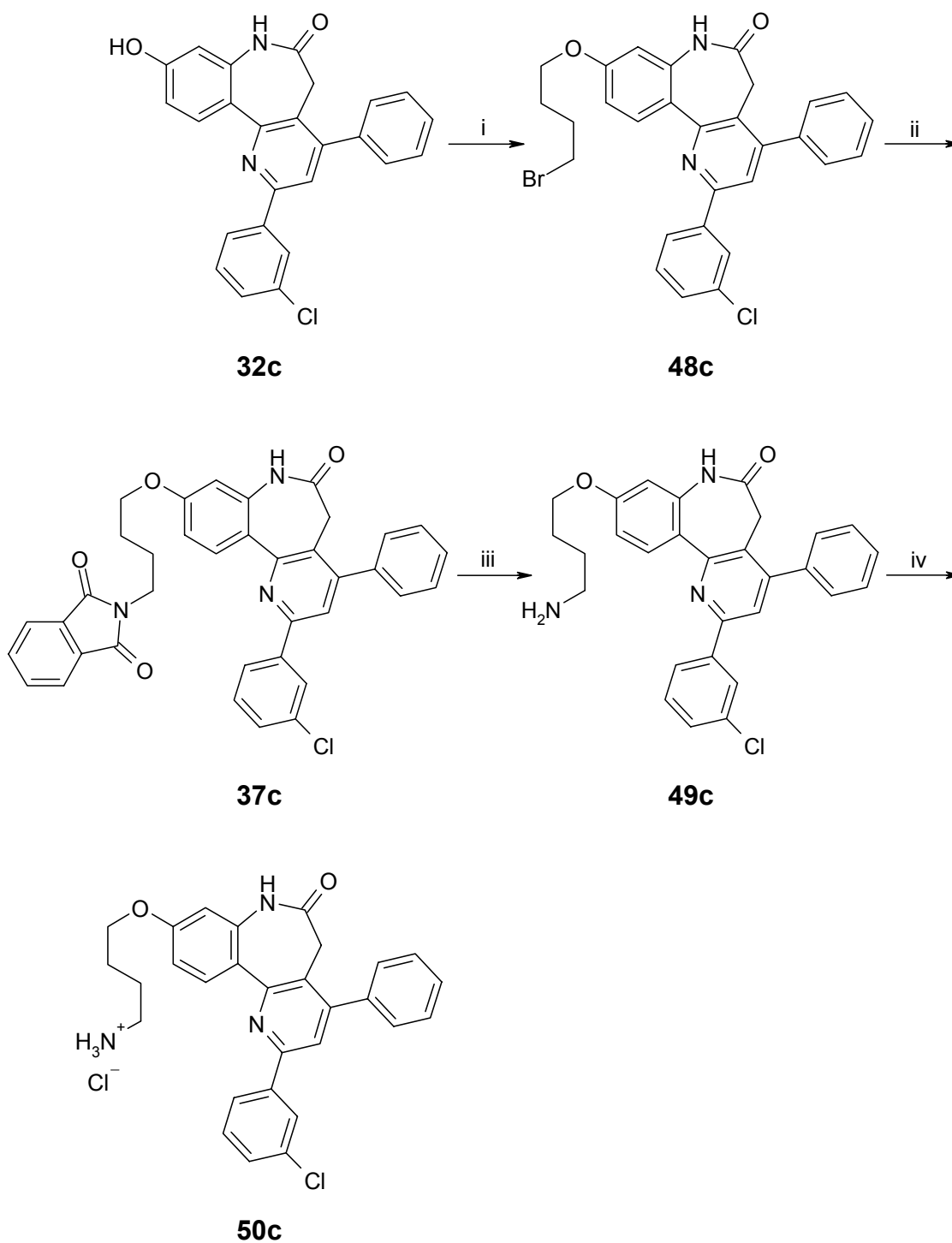
^a Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (i) Dibrombutan (**43**) K_2CO_3 , Aceton, reflux; 2h (ii) Kaliumphthalimid (**42**), DMSO, 90 °C 30 min (iii) Hydrazinmonohydrat, Ethanol, reflux, 2h (iv) HCl, Ethanol

Schema 3-35: Darstellung des Aminobutoxydarpon-Hydrochlorids **50b**^a



^a Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (i) Dibrombutan (**43**) K_2CO_3 , Aceton, reflux; 2h (ii) Kaliumphthalimid (**42**), DMSO, 90 °C 30 min (iii) Hydrazinmonohydrat, Ethanol, reflux, 2h (iv) HCl, Ethanol

Schema 3-36: Darstellung des Aminobutoxydarpon-Hydrochlorids **50c**^a

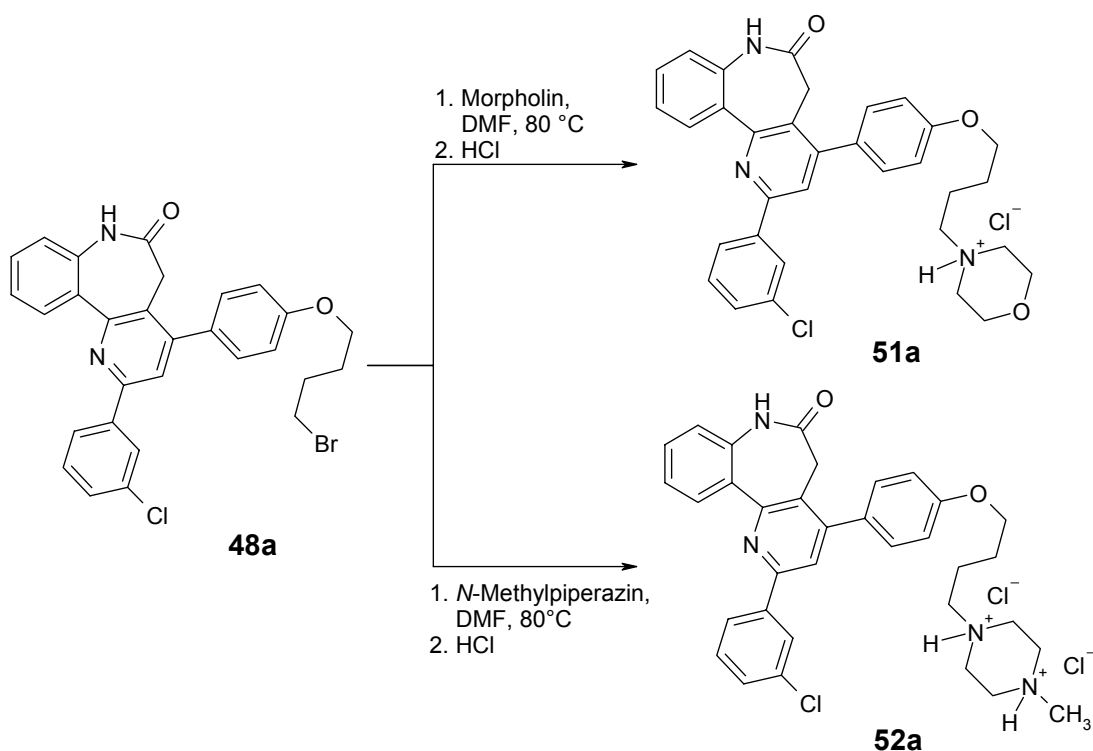


^a Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (i) Dibrombutan (**43**) K_2CO_3 , Aceton, reflux; 2h (ii) Kaliumphthalimid (**42**), DMSO, 90 °C 30 min (iii) Hydrazinmonohydrat, Ethanol, reflux, 2h (iv) HCl, Ethanol

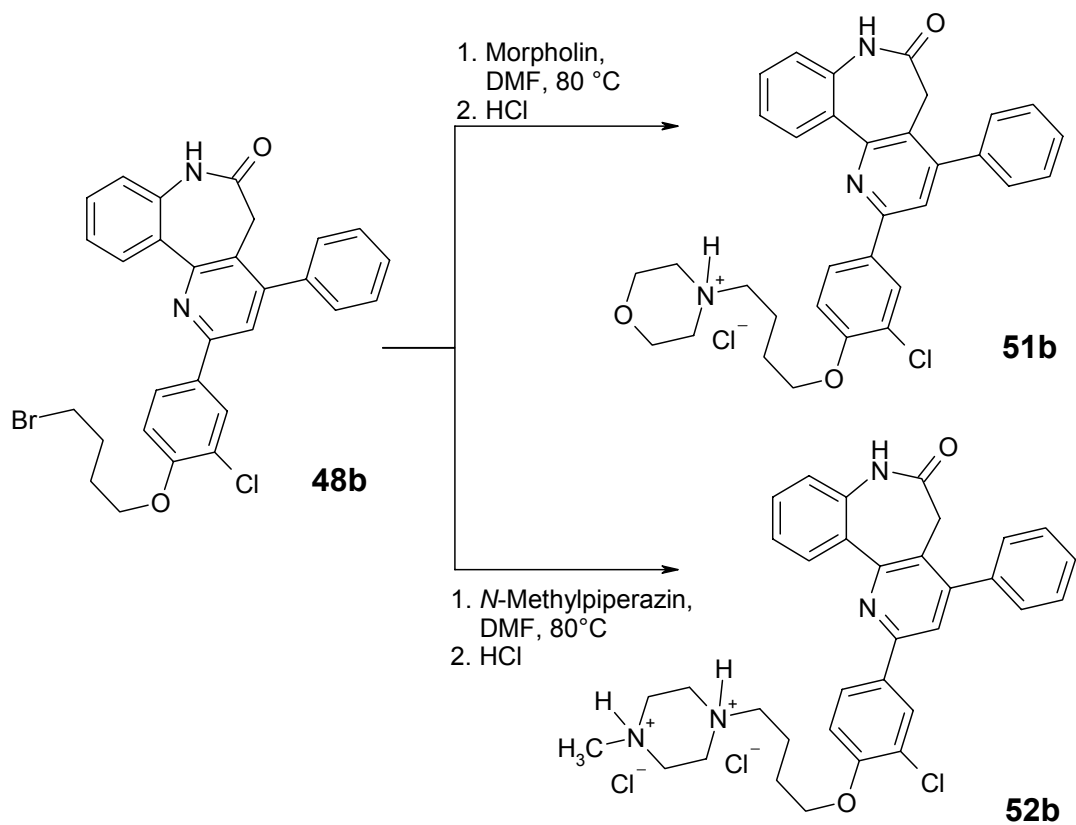
3.4.2 Synthese von Darponen mit tertiären Aminogruppen

Ein formuliertes Ziel dieser Arbeit war die Erzeugung wasserlöslicher Darponderivate um geeignete Verbindungen für weitere Testung in verschiedenen Tiermodellen zu ermitteln. Neben den Darponen mit primären Aminogruppen sollten auch tertiäre Aminoverbindungen in Form ihrer Hydrochloride synthetisiert werden. Dazu wurden die Brombutoxyderivate **48a-c** nach einer Vorschrift von Marshall et al.⁵⁵ mit Morpholin bzw. *N*-Methylpiperazin in DMF umgesetzt und anschließend durch Behandlung mit Salzsäure zu den Hydrochloriden **51** und **52** umgewandelt, die in Ausbeuten zwischen 28 bis 78 %, jeweils bezogen auf die als Edukt eingesetzte Bromverbindung **48**, erhalten wurde. Die Reaktionen sind in den folgenden Schemata 3-37 bis 3-39 aufgeführt.

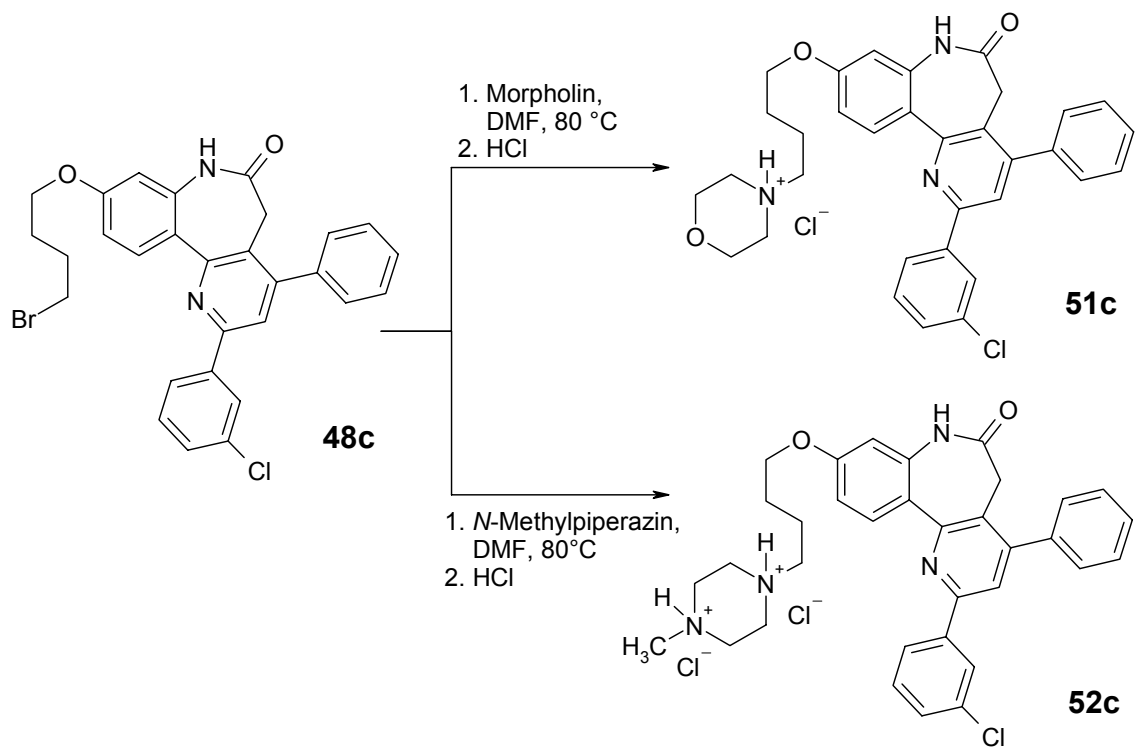
Schema 3-37: Die Synthese der Darponderivate **51a** und **52a**



Schema 3-38: Die Synthese der Darponderivate **51b** und **52b**



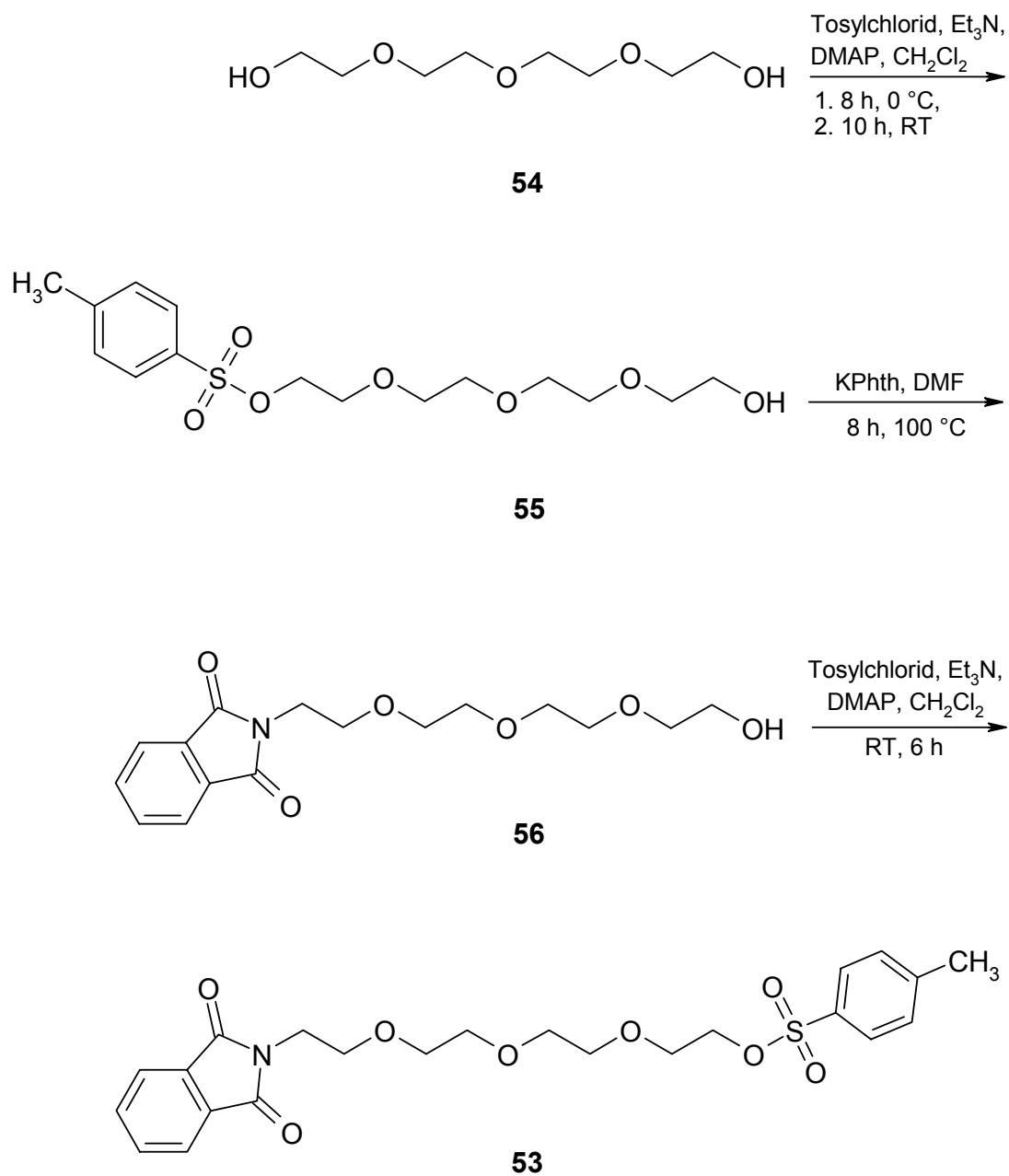
Schema 3-39: Die Synthese der Darponderivate **51c** und **52c**



3.5 Synthese von Darponen mit Polyoxyethylenseitenketten

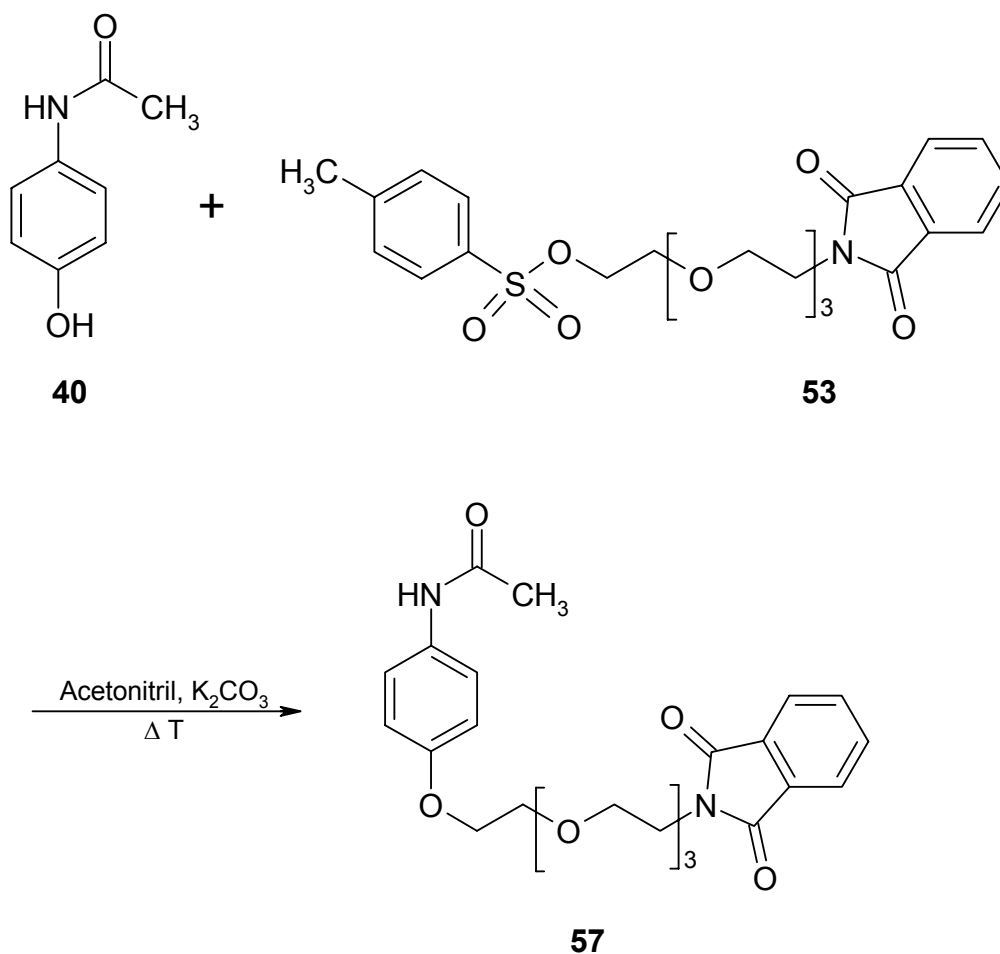
Bei der Suche nach intramolekularen Zielstrukturen mit Hilfe der Affinitätschromatographie haben sich Polyoxyethylenseitenketten für die Anknüpfung von Wirkstoffmolekülen an die Festphase als vorteilhaft erwiesen.^{56, 57} Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften von Oxyethylenketten ist davon auszugehen, dass bei Verwendung dieser Linker weniger unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem immobilisierten Wirkstoffmolekül und Proteinen auftreten. Ferner gewährleistet die längere Kette, die sich in wässrigem Medium durch *all-gauche* Konformation linear ausrichtet,⁵⁸ dass es nicht zu störenden sterischen Abstoßungseffekten zwischen dem Zielprotein der immobilisierten Verbindung und dem Trägermaterial kommt. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sollten daher Darpone mit Polyoxyethylenseitenketten synthetisiert und zur Immobilisierung verwendet werden. Die Anknüpfung war analog zur Synthese der Aminobutoxyverbindungen **49a-c** über die Veretherung der phenolischen Gruppen der Darponstrukturen **32a-c** geplant. Im Hinblick auf die in Kapitel 3.4 erörterten Probleme, die unter Verwendung von *N*-(4-Brombutylphthalimid) (**36**) aufgetreten waren, wurde eine alternative Abgangsgruppe für das Alkylans gewählt. Die Ethersynthese sollte mittels des Tosyllinkers **53** erfolgen, welcher nach einer Vorschrift von Jannsen et. al,⁵⁹ ausgehend von Tetraethylenglycol (**54**) dargestellt wurde. Im ersten Schritt erfolgte die Umsetzung mit Tosylchlorid in Gegenwart von Dimethylaminopyridin (DMAP) und Triethylamin als Hilfsbasen. Nach säulenchromatographischer Abtrennung des überschüssigen Edukts sowie Anteilen ditosylierten Nebenproduktes konnte das Monotosylat **55** durch Behandlung mit Kaliumphthalimid in DMF zum Phthalimid **56** umgewandelt werden. Die verbleibende Hydroxylgruppe im Molekül wird unter gleichen Bedingungen wie im ersten Reaktionsschritt mit Tosylchlorid zum gewünschten Produkt **53** verestert. Die Reaktionen sind in dem folgenden Schema 3-40 aufgeführt.

Schema 3-40: Synthese des Tosyllinkers **53**



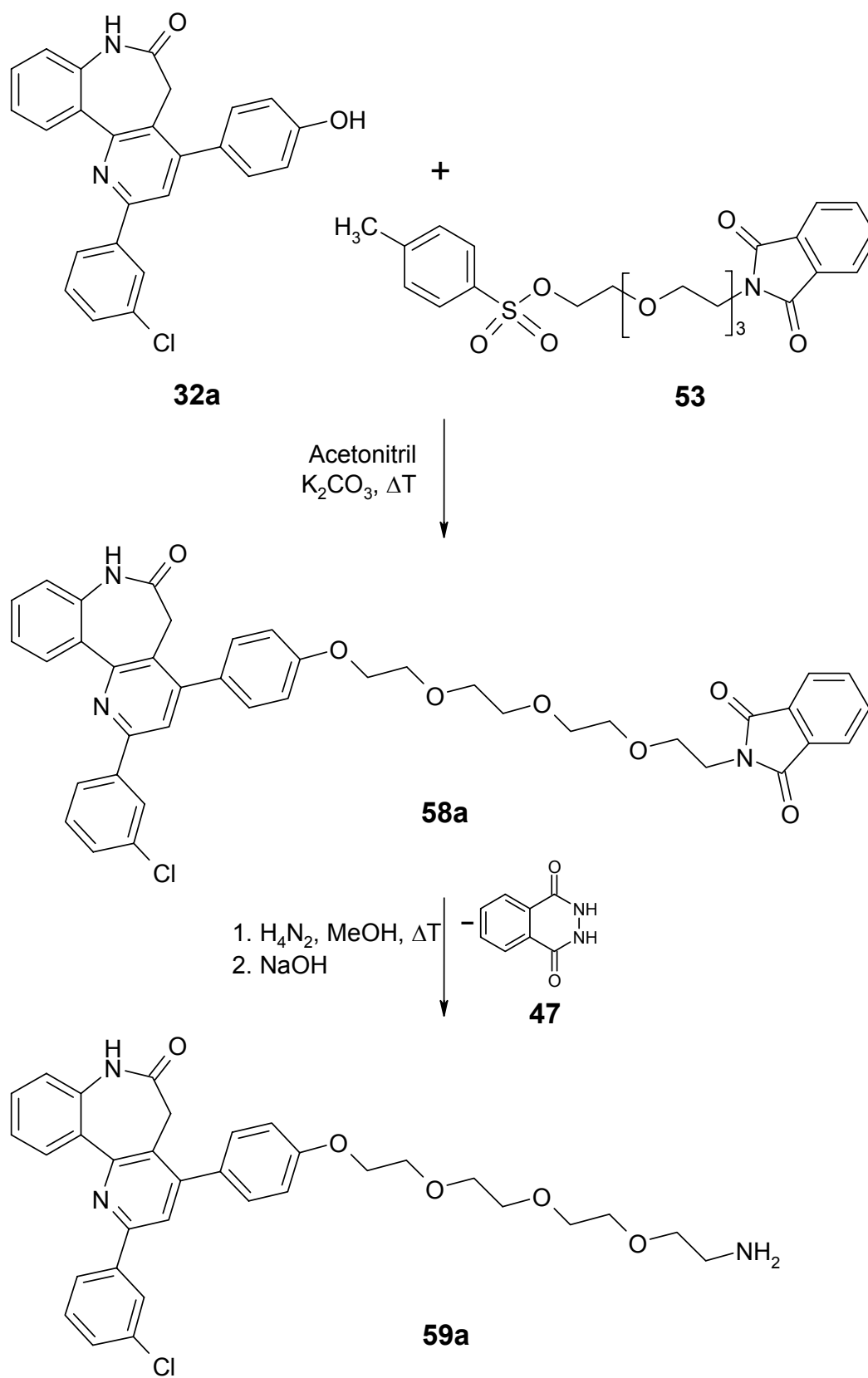
Der Tosylether **53**, der als hochviskoses Öl erhalten wurde, zeigte im Modellversuch mit Paracetamol (**40**) einen einheitlichen Reaktionsverlauf zum monosubstituierten Produkt **57** (Schema 3-41).

Schema 3-41: Reaktion von Paracetamol **40** mit dem Tosyllinker **53**

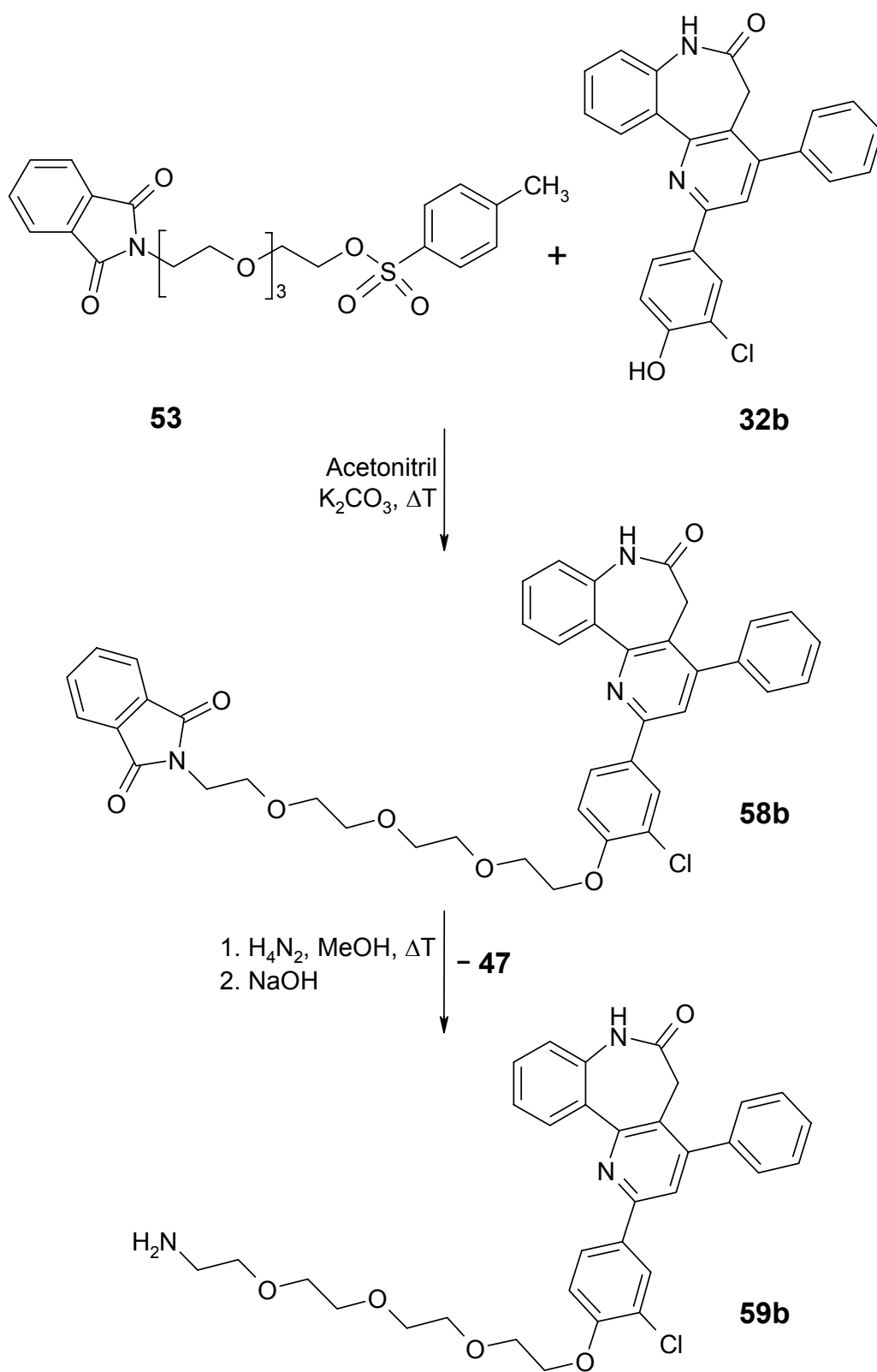


Die in Schema 3-41 genannten Reaktionsbedingungen ließen sich in guten Ausbeuten auf die Darstellung der Darpontetraethylenglycolphthalimide **58a-c** übertragen. Die anschließende Hydrazinolyse zu den freien Aminen **59a-c** wurde mit Hydrazinmonoydrat in siedendem Methanol durchgeführt. Bei der Bearbeitung konnte die Hauptmenge des als Nebenprodukt entstandenen Phthalsäurehydrazids **47** mit Dichlormethan ausgefällt werden. Verbleibende Reste von **47** wurden anschließend durch Extraktion mit Natronlauge abgetrennt. Die primären Amine **59a-c** wurden auf diese Weise in Ausbeuten von 30, 46 und 47 Prozent bezogen auf das jeweilige Phenol erhalten. Die Reaktionen sind in den folgenden Schemata dargestellt (Schema 3-42 bis 3-44).

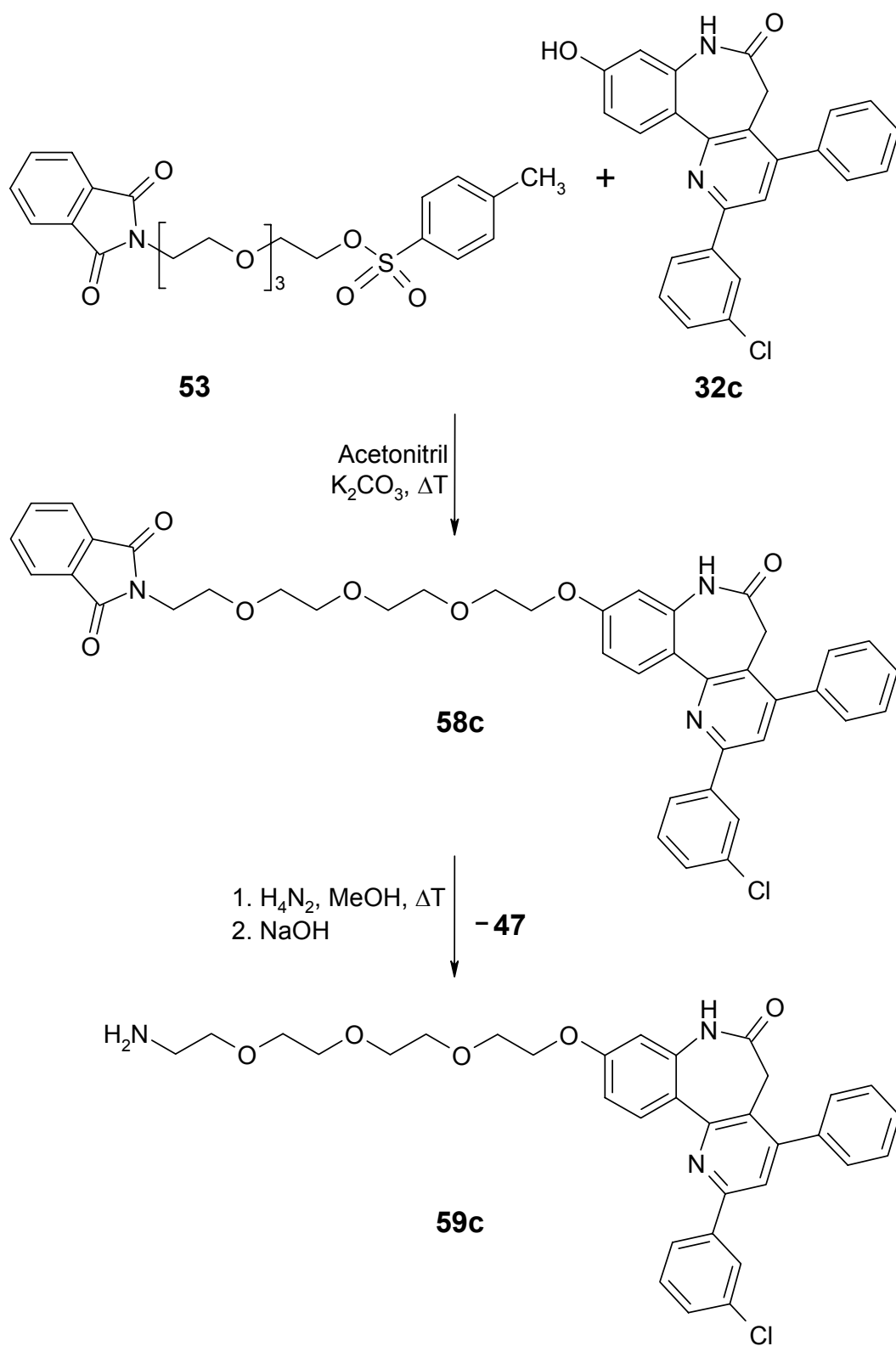
Schema 3-42: Darstellung des Aminotetraethylglycoldarpons **59a**



Schema 3-43: Darstellung des Aminotetraethylglycoldarpons **59b**



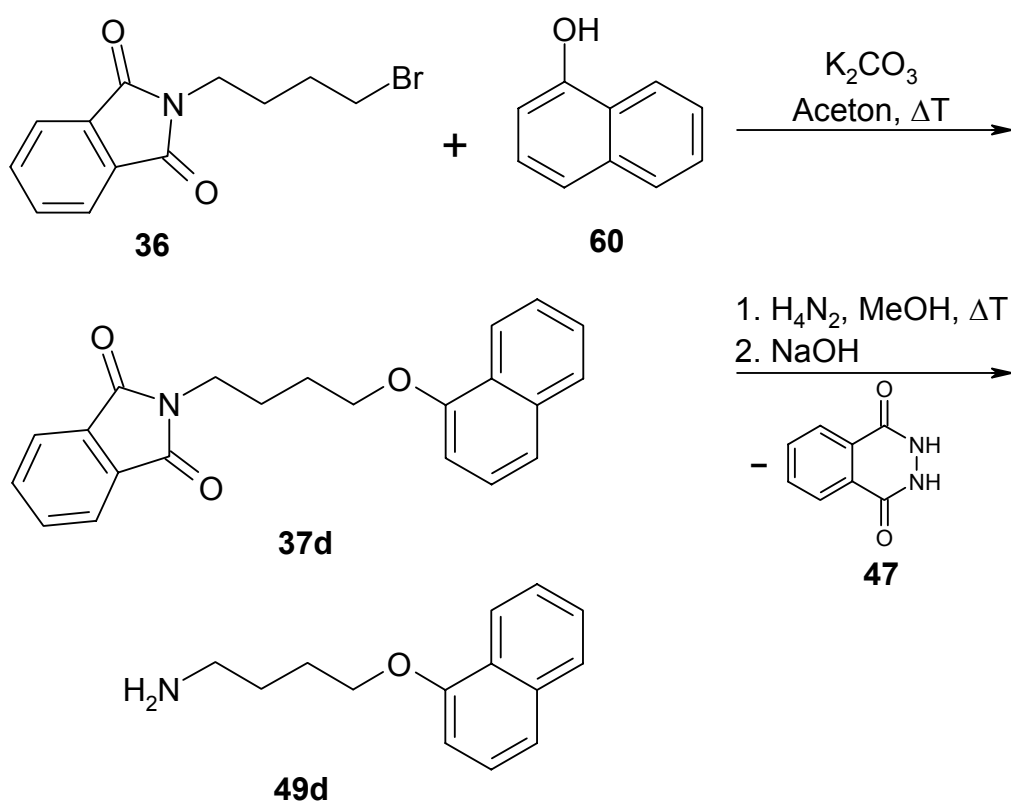
Schema 3-44: Darstellung des Aminotetraethylenglycoldarpons **59c**



3.6 Anknüpfung von Seitenketten an 1-Naphthol

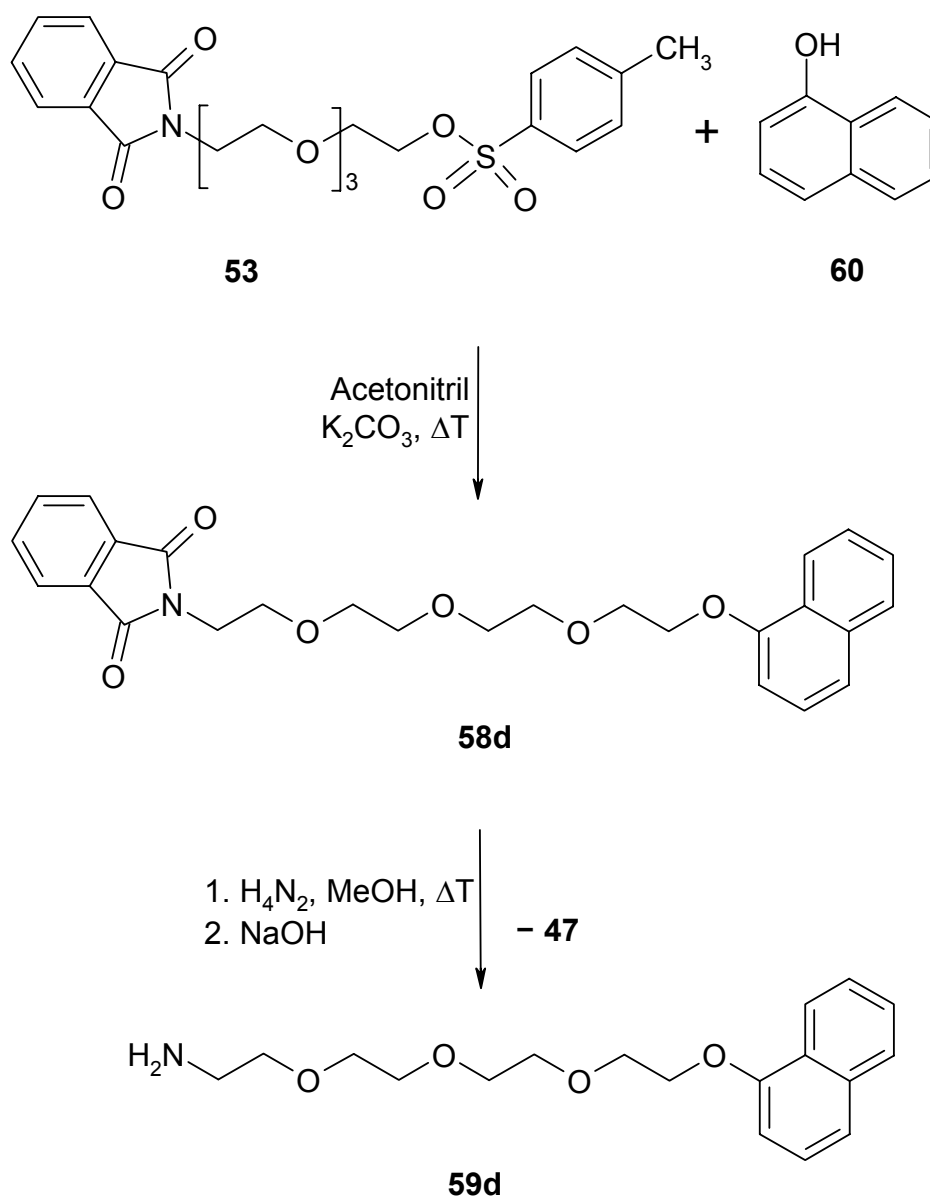
Die ersten Affinitätsuntersuchungen zum „Protein-Fishing“ wurden mit den Aminobutoxydarpone **49a-c** durchgeführt, die an verschiedenen Trägermaterialien immobilisiert worden waren. Im Ergebnis der Experimente zeigte sich stets eine sehr große Anzahl von Banden bei der gelchromatographischen Trennung der aus den Gewebehomogenaten gewonnenen Proteine (vergl. Kapitel 4-4-3). Als Ursache wurden unspezifische Wechselwirkungen der Darpone mit hydrophoben Arealen der im Extrakt enthaltenen Proteine vermutet. Um diese These zu verifizieren wurden Verbindungen hergestellt, die statt der Darponeinheit einen an die Linkerkette gebundenen 1-Naphthylrest als unspezifischen aromatischen Substituenten enthielten. Diese Strukturen sollten dann nach Immobilisierung an den entsprechenden Trägermaterialien als Kontrolle für die Detektion unspezifischer Proteinbindungen dienen.

Schema 3-50: Synthese des 4-(1-Naphthyloxy)-1-butanamins (**49d**)



Zu diesem Zweck wurde 1-Naphthol **60** analog der für die Darphone durchgeführten Synthesesequenzen mit einem Butoxy- und dem Tetraethylglycollinker verknüpft (Schema 3-50 und 3-51). Die Amine **49d** und **59d** konnten in Ausbeuten von 80% nach der von Jannsen⁵⁹ modifizierten Methode dargestellt werden.

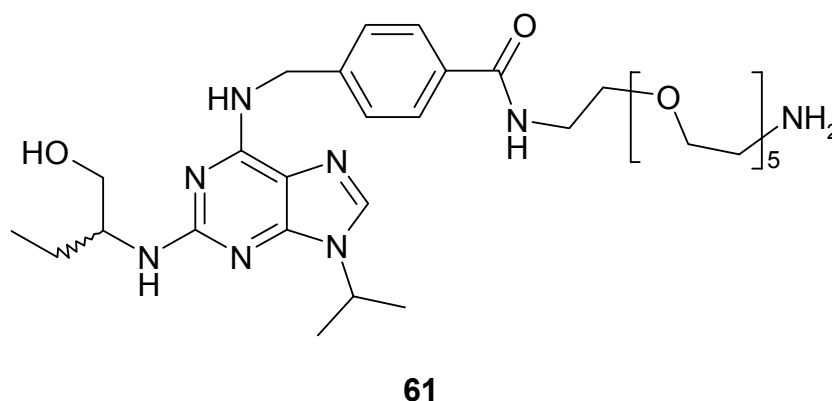
Schema 3-51: Umsetzung von 1-Naphthol **60** mit Tosyllinker **53**



3.7 Palladium-katalysierte Reaktionen am Iod-Darpon

Neben der Williamson-Veretherung sollten weitere Möglichkeiten zur Anknüpfung von Seitenketten an die Darponleitstruktur **2B** erprobt werden. Dieses war durch die Einführung einer Carboxylfunktion in Position 10 über die Iodfunktion der Verbindung **35d** geplant. Kommerziell erhältliche, langkettige Polyoxyethylendiamine sollten unter Standardbedingungen der Peptidsynthese über Carbonsäureamidbildung an diese gebunden werden. Bach et al. verwendeten für affinitätschromatographische Untersuchungen des *R*- und *S*-Roscovitins Derivate, die über eine Amidbindung mit einem langkettigen Linker verbunden waren (siehe Abb. 3-1).⁵⁷

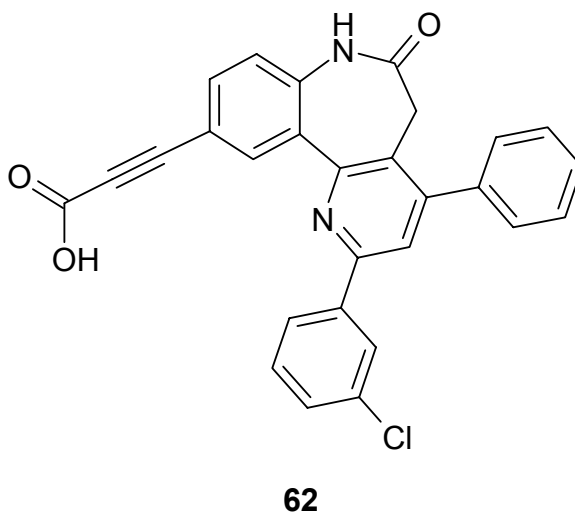
Abb. 3-1: (R/S) Roscovitin mit Polyoxyethylendiamin-Linker



Eine Synthese von Darponen ausgehend von Chalkon- oder Benzazepinonelementen, die bereits eine Carboxyl- oder Estergruppe tragen, wurde nicht angestrebt, da Probleme bei der basenkatalysierten *Michael*-Addition zu erwarten gewesen wären. Daher sollte die Einführung der Carboxylfunktion über Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen erfolgen, welche vielseitige Möglichkeiten zur Einführung Kohlenstoff-verknüpfter Substituenten in aromatische Systeme bieten. Die Heck-Reaktion ermöglicht eine Vinylierung von Halogenaromaten durch terminale Alkene unter Einsatz

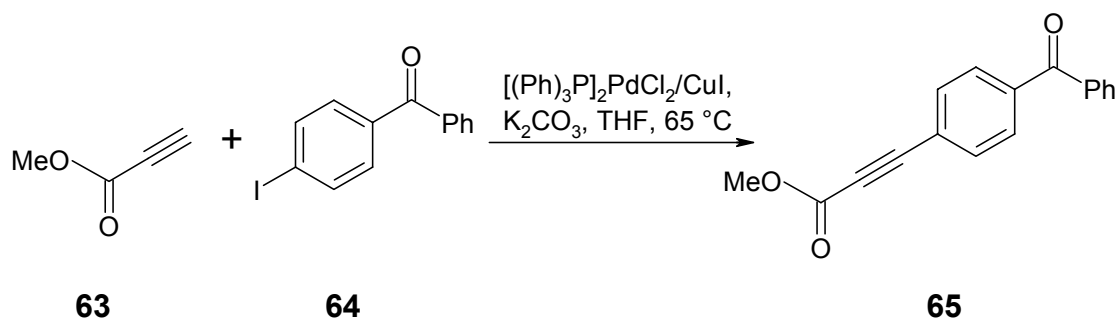
eines Palladium-Triarylphosphin-Katalysatorkomplexes in Gegenwart aliphatischer Amine.⁶⁰ Unter gleichen Bedingungen und der Verwendung von Kupferiodid als Co-Katalysator gelang Sonogashira et al. die Anknüpfung von Acetylenen an Halogenaromaten unter sehr milden Bedingungen.⁶¹ Die Stephens-Castro-Kupplung, in der die Substitution eines Halogens durch Umsetzung mit Kupferacetylenen in siedendem Pyridin erfolgt⁶², ist aufgrund der drastischen Reaktionsbedingungen sowie der notwendigen Darstellung der Kupferacetylene in seiner Anwendbarkeit stark eingeschränkt.⁶¹ Ausgehend vom Iod-Darpon **35d** war die Einführung einer acetylenischen Carboxylfunktion zur Propiolsäureverbindung **62** über die Sonogashira-Kupplung geplant.

Abb. 3-4: Geplante Zielstruktur über Palladium-katalysierte Reaktion



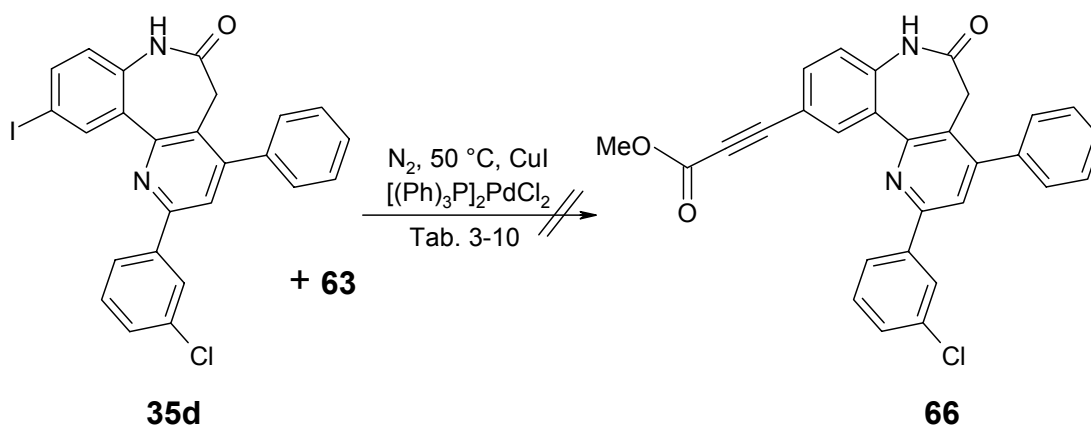
Die direkte Reaktion von Iodaromaten mit Propiolsäure ist bislang nur in zwei Publikationen für niedermolekulare Verbindungen in wässrigen Systemen beschrieben worden.^{63,64} Anastasia und Negishi⁶⁵ berichten über die Schwierigkeiten der Umsetzung von Mangel-elektronen-Alkinverbindungen, wie das Methylpropiolat (**63**), unter den Bedingungen nach Sonogashira. Unter Verwendung von Kaliumcarbonat in THF konnten De Kort et. al **63** mit 4-Iodbenzophenon (**64**) in moderaten Ausbeuten zum Alkin **65** umsetzen (Schema 3-52).⁶⁶

Schema 3-52: Kupplung von Methylpropiolat (**63**) nach De Kort ⁶⁶



Unter diesen Bedingungen war es jedoch nicht möglich, das Iod-Darpon **35d** mit Methylpropiolat (**63**) zur Esterverbindung **66** umzusetzen. Auch unter Verwendung von Diethylamin war keine Reaktion zu beobachten, während DMF und DMSO nach kurzer Zeit ein Produktgemisch von mindestens drei Komponenten lieferten. Eine säulenchromatographische Trennung der Ansätze konnte aufgrund ähnlicher R_f -Werte der entstandenen Produkte nicht vorgenommen werden, weshalb die Darstellung der Propiolsäureverbindung **62** über den Methylester **66** nicht weiter verfolgt wurde (Schema 3-53, Tabelle 3-10, (i)).

Schema 3-53: Kupplungsversuche von Methylpropiolat **63** mit Iod-Darpon **35d**

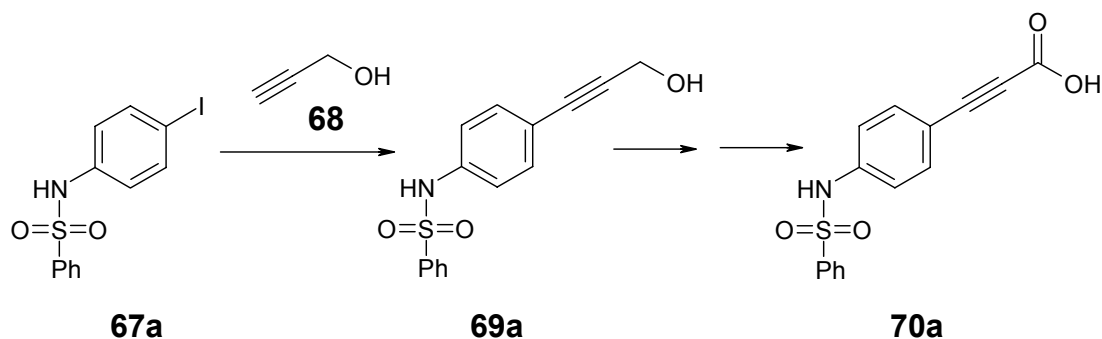


Tab. 3-10: Getestete Reaktionsbedingungen zu Schema 3-53

Versuch	Lösungsmittel	Base	Umsetzung ^a	Reaktionszeit
(i)	THF (ΔT)	K ₂ CO ₃ (2 äq.)	keine	4 h
(ii)	Et ₂ NH (50°C)	Et ₂ NH	keine	8 h
(iii)	DMF (50°C)	K ₂ CO ₃ (2 äq.)	Gemisch	30 min
(iv)	DMSO (20°C)	K ₂ CO ₃ (2 äq.)	Gemisch	30 min

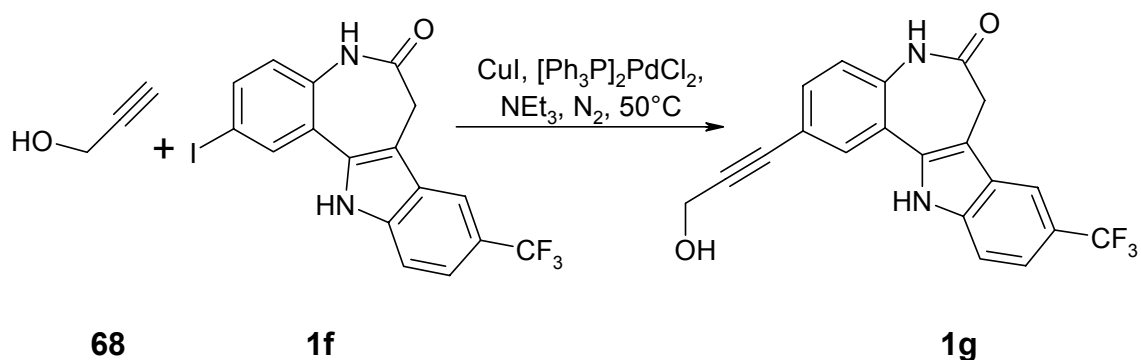
^a nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle

Bouchain et al. setzten das Iod-substituierte Arylsulfonamid **67a** in einer Sonogashira-Kupplung mit Propargylalkohol (**68**) zur Hydroxypropinylstruktur **69a** um, welche im Anschluss in zwei Stufen zur Carbonsäure **70a** oxidiert wurde (Schema 3-54).⁶⁷

Schema 3-54: Darstellung der Phenylpropionsäure **70a** nach Bouchain⁶⁷

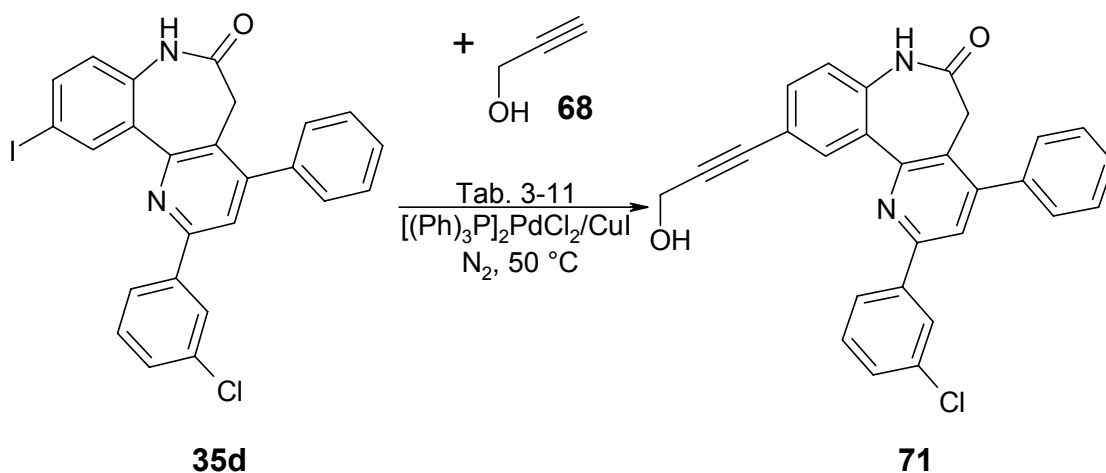
Es sollte versucht, werden den Syntheseweg nach Bouchain auf die Darstellung der Darponverbindung **62** zu übertragen. Kunick et al.²⁸ gelang bereits die Umsetzung des Paullonderivates **1f** mit Propargylalkohol (**68**) in Triethylamin zur acetylenischen Verbindung **1g** (Schema 3-55).

Schema 3-55: Sonogashira-Kupplung am Paullon **1f** mit Propargylalkohol (**68**)



Unter den von Sonogashira⁶¹ beschriebenen Bedingungen konnte für das Ioddarpon **35d** in Diethylamin keine Umsetzung beobachtet werden. Mit Hilfe von Kaliumcarbonat in DMF bei 50°C kam es dagegen zur spontanen Bildung des Produkts **71** nach Zugabe des Propargylalkohols (**68**) (Schema 3-56, (iii)). Die Bedingungen, unter denen die Reaktion getestet wurde, sind in Tabelle 3-11 wiedergegeben.

Schema 3-56: Sonogashira-Kupplung zum Propargyl-Darpon **71**



Tab. 3-11 : getestete Reaktionsbedingungen für Schema 3-56. Bei gleicher Edukt- und Katalysatormengen, Temperatur (50°C); N₂

Versuch	Lösungsmittel	Base	Umsetzung ^a	Reaktionszeit
(i)	Et ₂ NH	Et ₂ NH	unvollständig	14 h
(ii)	THF	Et ₂ NH	keine	8 h
(iii)	DMF	K ₂ CO ₃ (2 Äq.)	quantitativ	< 1 min

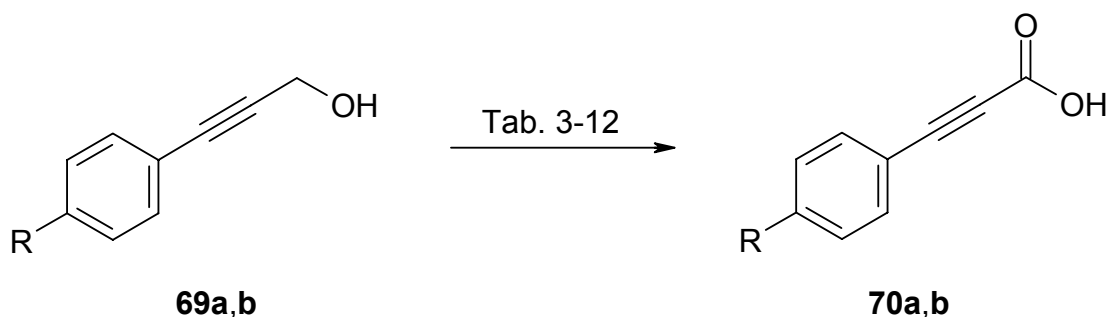
^a nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle

Das erhaltene 3-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-10-yl]prop-2-in-1-ol (**71**) sollte im nächsten Schritt zur Carbonsäure **62** oxidiert werden.

3.8 Versuche zur Oxidation des 3-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-10-yl]prop-2-in-1-ols

Bouchain et al. führen zur Darstellung der eine Phenylpropionsäure **70a** eine zweistufige Oxidation durch (vergl. Schema 3-57). Im ersten Schritt wird die Hydroxypropinylverbindung **69a** mit Dess-Martin-Periodinan zur aldehydischen Zwischenverbindung (ohne Abb.) umgesetzt, die im Anschluss mit Natriumchlorit zur Carbonsäure **70a** oxidiert wird.⁶⁷ Zhao und Tashino beschrieben hingegen die Oxidation des 3-Phenyl-propargylalkohols (**69b**) zur Carbonsäure **70b** unter Katalyse von 2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl (TEMPO) jeweils in einer Einschrittreaktion (Schema 3-57).^{68, 69}

Schema 3-57: Oxidationen von Phenylpropargylalkoholen in der Literatur



Tab. 3-12: Beschriebene Reaktionsbedingungen zum Schema 3-57

Autor	Edukt	R	Lösungsmittel	Reagenz
Bouchain ⁶⁷	69a	PhSO ₂ HN-	(i) ACN (ii) <i>tert</i> -Butanol	(i) Dess-Martin (ii) NaClO ₂ / Na ₂ PO ₄
Zhao ⁶⁸	69b	H	ACN/H ₂ O	NaClO ₂ /NaClO, TEMPO
Taschino ⁶⁹	69b	H	Aceton/ H ₂ O	Poly[4-diacetoxiod)styren] TEMPO

Zhao et al. erzielen unter Verwendung von stöchiometrischen Mengen Natriumchlorit als Oxidationsmittel und einer katalytischen Menge an Natriumhypochlorit Ausbeuten von 90 Prozent. Die praktische Durchführung dieser Reaktion ist jedoch sehr aufwendig. Sie erfordert, neben genauer Temperatur- und pH-Werteinstellung, eine simultanen Zugabe der Natriumsalzlösungen. Aufgrund der katalytischen Mengen gestaltet sich dieses bei der Natriumhypochloritlösung sehr schwierig. Die hohen Ausbeuten ließen sich in Untersuchungen innerhalb des Arbeitskreises nicht reproduzieren.⁷⁰

Taschino et al. erhalten die 3-Phenyl-propionsäure (**70b**) in guten Ausbeuten mit Poly[4-diacetoxiod]styren] als Oxidationsmittel und vermeiden dadurch aufwendige pH-Einstellungen und Stabilitätsprobleme, die bei Oxidationen mit Natriumchlorit auftreten. Alternativ zur Polymer-gestützten Synthese benutzen De Mico et al. das kommerziell erhältliche (Diacetoxiod)benzen (**72**) zur Darstellung von Aldehyden aus primären Alkoholen.⁷¹

Die beabsichtigte Oxidation des Hydroxypropinyldarpons **71** unter Verwendung von **72** als Oxidationsmittel nach den Reaktionsbedingungen von Tashino blieb jedoch erfolglos. Wie die dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktionsgemische zeigte, entstand ein Produktgemisch, welches jedoch säulenchromatographisch nicht getrennt werden konnte. Eine Entstehung der Propionsäure **62** war zudem unwahrscheinlich, da sich keine Komponente des Substanzgemisches bei Extraktionsversuchen in einer wässrig-alkalischen Phase löste (Schema 3-58). Auch die in Tabelle 3-13 zusammen gefassten Modifikationen der Reaktionsbedingungen führten nicht zu besseren Ergebnissen. Die beabsichtigte Anknüpfung von Linkern über Carbonsäureamidgruppen unter Verwendung von **62** als Intermediat wurde daher nicht weiter verfolgt.

Schema 3-58: Oxidationsversuche

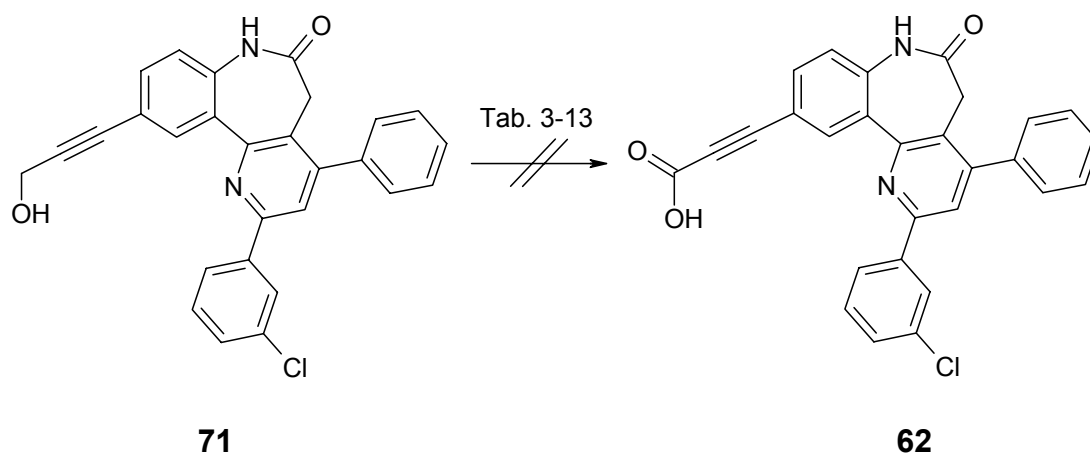


Tabelle 3-13: getestete Reaktionsbedingungen zu Schema 3-58

Lösungsmittel	Oxidationsmittel	Äq.	Katalysator	Reaktionsprodukte ^a
Aceton	PhI(OAc) ₂ (72)	2	TEMPO	Produktgemisch (12 h)
tert-Butanol	PhI(OAc) ₂ (72)	2	TEMPO	Produktgemisch (2 h)
tert-Butanol	PhI(OAc) ₂ (72)	3	TEMPO	Produktgemisch (2 h)
tert-Butanol	KNO ₃ /KMnO ₄	5/5	-	Produktgemisch (30 min)

^a nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle

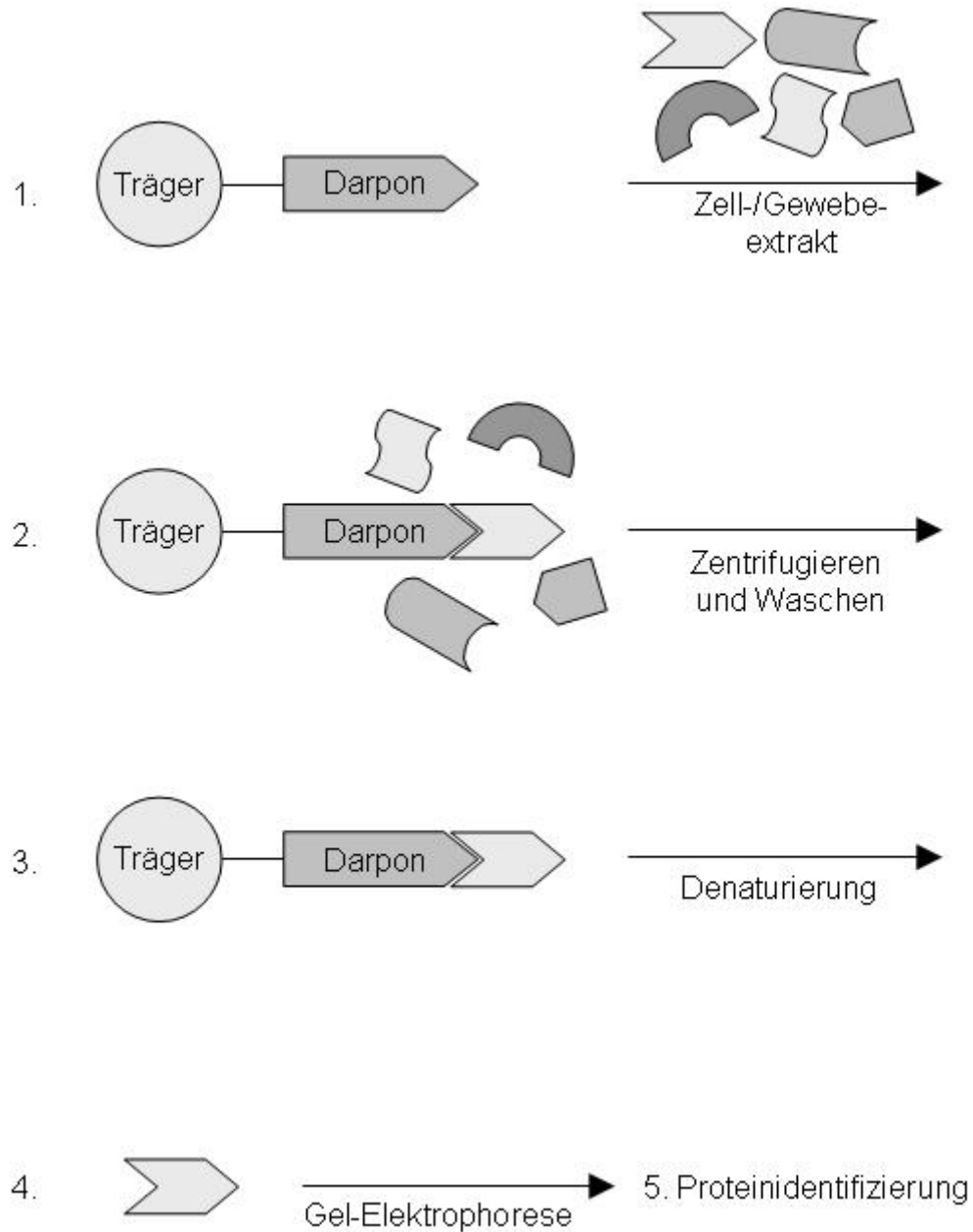
4 Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen

4.1 Ziel und Prinzip der Untersuchungen

Die Substanzklasse der Darpone zeigt eine ausgeprägte antiproliferative Aktivität im *in vitro* Antitumor Drug Screening (ADS). Der Mechanismus, der dieser Wirkung zugrunde liegt, konnte durch vorausgegangene Untersuchungen bislang nicht geklärt werden. Durch Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Paullonen konnten in dieser Wirkstoffklasse neben der bekannten Zielstruktur die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) und die Malatdehydrogenase (MDH) als intrazelluläre Targets identifiziert werden.

Für die Durchführung der Affinitätsuntersuchungen mit Darponen wurden die erzeugten Darponderivate mit aminogruppenhaltigen Seitenketten (vergl. Kapitel 3) an verschiedene Trägermaterialien geknüpft, welche anschließend mit Zell- und Gewebeextrakten inkubiert wurden. Dabei kamen insbesondere solche Krebszelllinien zum Einsatz, die von Darponen überdurchschnittlich gehemmt werden. Die Wirkstoff-affinen Proteine werden während der Inkubation von den immobilisierten Verbindungen adsorbiert, während der in Lösung befindliche Rest durch Zentrifugieren und Waschvorgänge abgetrennt werden kann. Durch Zugabe von Laemmli-Pufferlösung werden die Proteine durch das darin enthaltene Tensid und Reduktionsmittel unter Hitzebehandlung denaturiert und im Anschluss mittels Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen getrennt. Nach Detektion der erhaltenen Proteinbanden mittels Silberfärbemethode oder Coomassie-Blau erfolgte die Identifizierung durch Mikrosequenzierung (siehe Abschnitt 4.3.3). Die Arbeitsschritte sind in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abbildung 4-1).

Abb. 4-1: Affinitätsuntersuchung mit immobilisiertem Darpon mit anschließender Proteinidentifizierung



Legende zu Abbildung 4-1: 1. Inkubation des immobilisierten Darpons mit Gewebe-/Zelleextrakt
 2. Bindung der Darpon-affinen Proteine mit anschließender Reinigung durch Zentrifugations- und Waschvorgänge
 3. Denaturierung durch Tensid und Reduktionsmittelzugabe unter Hitzeeinwirkung
 4. Trennung der Proteine nach molekularen Massen durch Gelelektrophorese
 5. Isolierung und Identifizierung der Proteinbanden durch Mikrosequenzierung.

4.2 Affinitätsuntersuchungen

4.2.1 Affinitätschromatographie

Ein wichtiges Instrument für die Isolierung biologisch aktiver Proteine ist die Affinitätschromatographie. Sie beruht auf der Eigenschaft vieler Proteine spezifische, nicht-kovalente und reversible Bindungen mit bestimmten Molekülen eingehen zu können, die als Liganden bezeichnet werden. Zu diesen Wechselwirkungen zählen unter anderen Antikörper-Antigen-, Enzym-Substrat- oder Hormon-Rezeptor-Interaktionen. Für die Affinitätschromatographie wird der Ligand des zu isolierenden Proteins kovalent an eine feste Matrix gebunden. Schickt man eine Probe über diese stationäre Phase, so wird das gewünschte Protein spezifisch vom immobilisierten Liganden zurückgehalten, während der Rest von der Säule gewaschen werden kann. Durch Wahl geeigneter Elutionsbedingungen lässt sich im Anschluss das angereicherte Protein von der Matrix ablösen und in reiner Form gewinnen.⁷² Da in dem für die Experimente verwendeten Verfahren die Auftrennung nicht mittels stationärer und mobiler Phase erfolgte, entspricht die Bezeichnung der Methode nicht exakt der Definition für Chromatographie. Im Folgenden wird daher der Begriff Affinitätsuntersuchungen benutzt.

4.2.2 Trägermaterialien

Trägermaterialien, die für Affinitätschromatographie verwendet werden, müssen bestimmte Eigenschaften besitzen. Wichtigste Voraussetzung ist das Vorhandensein von funktionellen Gruppen, an denen nach entsprechender Aktivierung die Liganden kovalent gebunden werden können. Das große Oberflächen-Volumen-Verhältnis makroporöser Gele bedingt eine große Bindungskapazität und erleichtert die Interaktion von Liganden mit höhermolekularen Substanzen. Um unerwünschte Wechselwirkungen von Proteinen mit dem Trägermaterial zu vermeiden, sollte dieses über neutrale und

hydrophile Eigenschaften verfügen. Darüber hinaus erfordern Grundoperationen, wie Derivatisierung zwecks Aktivierung und Autoklavierung zur Sterilisation eine gute chemische und physikalische Stabilität. Quervernetzte Agarose, Dextrane und Polyacrylate zählen zu den Stoffen, die über diese Eigenschaften verfügen und vielfach in der Affinitätschromatographie zum Einsatz kommen.⁷²

4.2.3 Liganden

Liganden, die in der Affinitätschromatographie verwendet werden, sollten spezifische und reversible Bindungen mit dem zu isolierenden Protein eingehen können. Dieser Komplex sollte ohne irreversible Veränderung der beteiligten Partner durch einfache Veränderungen des Mediums wieder dissoziieren können. Darüber hinaus muss ein Ligand über mindestens eine funktionelle Gruppe verfügen, die eine Immobilisierung am aktivierten Trägermaterial ermöglicht, ohne dabei essentiell für die spezifische Bindung des Proteins zu sein. Als weitere Eigenschaft muss der Ligand mit den im Kupplungsprozess verwendeten Reagenzien und Lösungsmitteln kompatibel sein.⁷²

4.2.4 Immobilisierung

Die Immobilisierung eines Liganden beinhaltet prinzipiell drei Schritte. Im ersten Schritt muss das Trägermaterial aktiviert werden. Die Art und Weise der Aktivierung richtet sich dabei nach der im Liganden enthaltenen funktionellen Gruppe. Im zweiten Schritt erfolgt die Kupplungsreaktion des Liganden mit dem Trägermaterial. Verbleibende aktivierte Gruppen müssen zur Vermeidung von unerwünschten Wechselwirkungen im letzten Schritt durch geeignete Reagenzien deaktiviert werden. Bei der Immobilisierung niedermolekularer Liganden kommt es bei der Adsorption des Gegenliganden häufig zu sterischen Hinderungen. Hierbei empfiehlt sich die Verwendung eines sog. Spacers, der

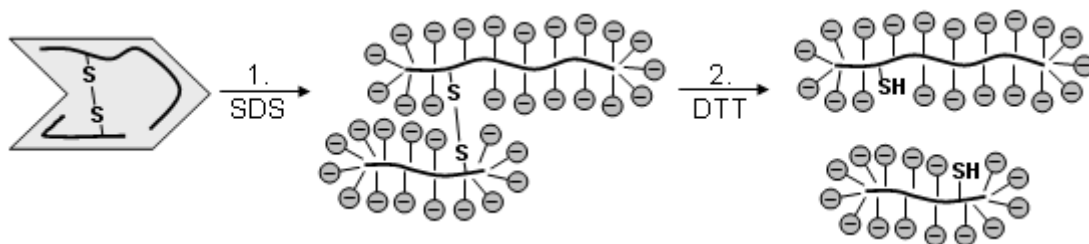
aus einer linearen Molekülkette besteht und vor Immobilisierung des Liganden an die Matrix gekoppelt wird. Diverse Trägermaterialien dieser Art können in aktivierter Form kommerziell bezogen werden. Alternativ zur Verwendung eines Spacers kann auch der Ligand mit einer linearen Molekülkette versehen werden, die man in diesem Fall als Linker bezeichnet. Vorhersagen über die Eignung bestimmter Liganden in Kombination mit Linkern oder Spacern und Trägermaterialien sind in der Regel nicht möglich und müssen daher empirisch ermittelt werden.⁷²

4.3 Proteinidentifizierung

4.3.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Shapiro ermöglicht eine Trennung von Proteinen anhand der Molekularmasse. Grundlage dieser Methode ist die Denaturierung der Proteine durch Einsatz des Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS), welches sich durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Protein anlagert. Zum einen werden dadurch unlösliche Lipoproteine solubilisiert und somit der elektrophoretischen Trennung zugänglich gemacht. Zum anderen kommt es durch Auflösung der lipophilen Wechselwirkungen und hydrophilen Wasserstoffbrücken innerhalb des Proteins zu einer Zerstörung von Quartär- bis Sekundärstruktur. Die resultierenden anionischen SDS-Polypeptidmizellen tragen eine konstante negative Nettoladung pro Masseneinheit. Zusätzlich werden unter Hitzeeinwirkung und Verwendung von Reduktionsmitteln, wie Dithiothreitol (DTT), die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken im Protein gespalten (Abbildung 4-2).⁷³

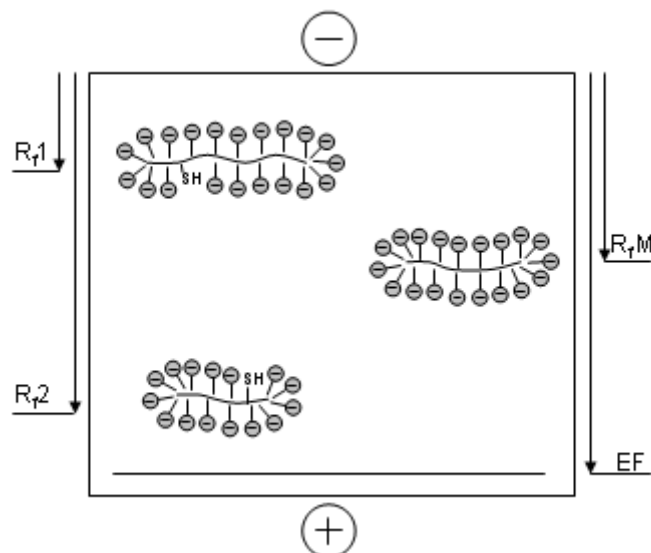
Abb. 4-2: Probenvorbereitung für die SDS-PAGE



Legende zu Abbildung 4-2 (verändert nach Michow⁷³): Die räumliche Struktur des Proteins ist durch die geometrische Form symbolisiert, während die Polypeptidketten durch schwarze Linien dargestellt werden. Die SDS-Moleküle lagern sich in Schritt 1 mit ihrem hydrophoben Teil am Protein an, der anionische Kopf richtet sich dabei nach außen. Nach Spaltung der Disulfidbrücken im 2. Schritt erhält man lineare Polypeptidfragmente mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit.

Nach Anlegen einer Spannung wandern die anionischen SDS-Polypeptidmizellen in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse innerhalb des Gels in Richtung der positiv geladenen Anode. Proteine mit niedrigeren molekularen Massen weisen dabei eine größere Laufgeschwindigkeit auf als die höheren Molekulargewichte. Aus dem Logarithmus der Molekularmasse und der relativen Laufstrecke eines Proteins ergibt sich aufgrund der konstanten Nettoladung pro Masseeinheit die lineare Beziehung $R_f = f(\lg M_r)$. Aus dieser Gleichung lassen sich für unbekannte Proteine durch Vergleich mit R_f -Werten parallel injizierter Markerproteine die Molekularmassen ableiten (Abbildung 4-3).

Abb. 4-3: Trennung der Proteine anhand der Molekularmasse



Legende zu Abbildung 4-3 (verändert nach Michow⁷³): EF = Elektrophoresefront; R_fM = relative Laufstrecke eines Proteinmarkers bekannter Molekularmasse; R_f1 , R_f2 = relative Laufstrecke des Proteinfragments 1 und 2 mit hoher bzw. geringer unbekannter Molekularmasse, (+) Anode, (-) Kathode.

Für die durchgeführten Arbeiten wurden Fertiggele mit diskontinuierlichem Trennungssystem verwendet, bei dem zwei unterschiedlich stark vernetzte Acrylamidgele zum Einsatz kommen. Das weitmaschige Sammelgel bewirkt eine Konzentrierung der Proteine zu einer engen Bande von dem Eintritt in das engmaschige Trenngel, wodurch eine hohe Auflösung und Bandenschärfe

erreicht wird. Im Verlauf der Elektrophorese müssen die Proteine zusätzlich pH - und Ionenstärke-Diskontinuitäten eines TRIS-Chlorid-Glycinat Puffersystems überwinden. Die Gradiententechnik ermöglicht eine gute Trennleistung für SDS-denaturierte Proteine mit relativen Molekülmassen von 15 – 150 kDa.⁷³

4.3.2 Auswertung der Protein-Pherogramme

Nach erfolgter Trennung eines Proteingemischs durch die SDS-PAGE erfolgt die Auswertung des Elektropherogramms. Hierfür müssen die Proteinbanden zunächst in ihrer Position fixiert und im Anschluss durch Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Die *Fixierung* kann durch Proteinfällung infolge Denaturierung oder durch chemische Bindung zwischen den Proteinmolekülen erfolgen. Zur Fällung werden Mischungen aus Ethanol-Essigsäure-Wasser verwendet. Dabei beschädigen der Ethanol und der niedrige pH -Wert die Hydratationshülle der Proteine, wodurch deren Löslichkeit stark herabgesenkt wird und es zur Präzipitation kommt. Durch Einsatz von Glutardialdehyd kommt es zur Reaktion von Aminogruppen benachbarter Proteine, die daraufhin ein unlösliches Netz im Gel ausbilden. Eine sehr empfindliche Detektionsmethode für Proteine ist die Silberfärbung. Mit ihrer Hilfen lassen sich noch Proteinkonzentrationen von 1 bis 0,1 ng pro mm² visualisieren. Nach Fixierung durch Ethanol-Essigsäure mit anschließender Glutardialdehyd-Behandlung folgt die *Sensibilisierung* mittels Silbernitratlösung. Dabei bilden sich, durch Reduktion an den funktionellen Gruppen der gebundenen Proteine, Silberkeime, die beim *Entwickeln* mittels alkalischer Formaldehydlösung die Reduktion der restlichen in Lösung befindlichen Silberionen zu elementaren Silber katalysieren. Die orange-braune bis schwarze Verfärbung der Proteinbanden wird durch Zugabe von Silber-komplexierender EDTA-Lösung gestoppt. Die Nachteile dieser Methode liegen in dem hohen Aufwand, der notwendigen Verwendung extrem reiner Chemikalien und einer schlechten Reproduzierbarkeit der Proteinfärbung. Außerdem sind die isolierten Banden nicht für die folgende Proteinanalytik geeignet. Hierfür wird die

Blaufärbemethode nach Coomassie angewendet. Diese stellt ein kombiniertes Verfahren zur Fixierung und Färbung von Proteinbanden in SDS-Gelen mit geringem Aufwand dar. Kommerziell erhältliche Fertiglösungen enthalten neben Alkohol-Essigsäure zur Fixierung Triphenylmethanfarbstoffe, die von den Proteinbanden adsorbiert werden. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass die Empfindlichkeit um den Faktor 100 geringer als die der Silberfärbung ist.⁷³

4.3.3 Proteinidentifikation mit Hilfe der Mikrosequenzierung

Die Proteinidentifikation der isolierten Banden erfolgte durch Mikrosequenzierung und wurde bei einem kommerziellen Anbieter (BioVallée-Proteomics, Belgien) in Auftrag gegeben. Zum allgemeinen Verständnis sollen hier einige Grundlagen dieser Technik erläutert werden. Für die Proteinidentifikation werden die aufgearbeiteten Proteinproben einem proteolytischen Verdau unterzogen, indem sie mit einer Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert werden. Trypsin ist eine Endoprotease, die Aminosäureketten C-terminal nach jedem Arginin und Lysin spaltet, wobei Peptide entstehen, deren Massen jeweils charakteristisch und einzigartig für das jeweilige Protein sind. Durch anschließenden Vergleich der experimentell ermittelten Peptidmassen der Probe mit den in einer Datenbank gespeicherten Daten kann daher auf die Identität des zu analysierenden Proteins geschlossen werden.⁷⁴ Die Bestimmung der Peptidmassen erfolgt durch MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie) oder mit Hilfe der Nano-HPLC unterstützten Q-TOF-MSMS (Quadrupol Time of Flight-MS). Bei MALDI werden die Peptide aus dem tryptischen Verdau mit einer organischen Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure) auf einer metallischen Oberfläche kokristallisiert. Die Matrixmoleküle ermöglichen eine schonende Ionisierung der Peptide durch gepulsten Laserbeschuss niedriger Energie. Anschließend werden die Peptidionen unter Hochvakuum in einem elektrischen Feld beschleunigt und nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt. In der TOF-Einheit wird zu diesem Zweck sehr präzise die Flugzeit der Ionen

gemessen. Ionen hoher Masse oder niedriger Ladung benötigen für die Flugstrecke länger als Ionen mit kleiner Masse oder hoher Ladung. Da nach Laserionisierung häufig nur einfach positiv geladene Ionen entstehen, kann in den meisten Fällen von der Flugzeit direkt auf die Masse eines Peptidions geschlossen werden. Im Falle der Q-TOF-MSMS lässt sich aus den Peptiden des Verdau ein einzelnes aus der ersten TOF-Einheit selektieren, das dann in einer Kollisionskammer bei dem Zusammenstoß mit Argonatomen zerbricht. Die entstehenden Bruchstücke werden in der 2. TOF-Einheit getrennt und die detektierten Fragmente der Peptidkette durch die Massenunterschiede auf die Aminosäureabfolge des Peptids analysiert.⁷⁵

4.4 Affinitätsuntersuchungen mit Darponen

4.4.1 Auswahl eines geeigneten Trägermaterials

Zur Ermittlung eines geeigneten Systems für die Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen wurden vier verschiedene kommerziell erhältliche Trägermaterialien getestet. Alle waren im aktivierten Zustand erhältlich, unterschieden sich jedoch in der Art der Aktivierung und in der An- bzw. Abwesenheit eines Spacers. Die Merkmale der verwendeten Trägermaterialien sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

Tab. 4-1: Merkmale der getesteten Matrices

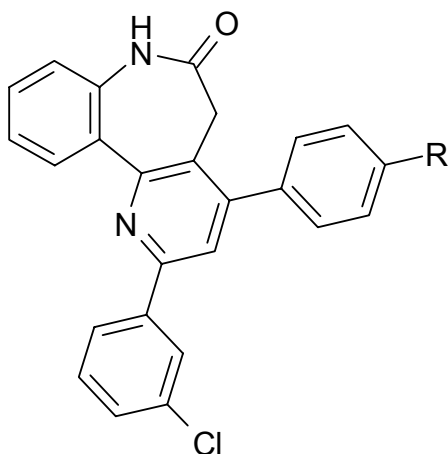
Bezeichnung	Spacer	Aktivierung
Reacti-Gel [®] (73)	-	Carbonyldiimidazol
Affigel [®] 10 (74)	10 Atome	N-Hydroxysuccinimid
Affigel [®] 15 (75)	15 Atome	N-Hydroxysuccinimid
CNBr-aktivierte Sepharose [®] 4B (76)	-	Cyanbromid

4.4.2 Kupplungsreaktion

Die verwendeten Trägermaterialien erforderten unterschiedliche Reaktionsbedingungen für die Immobilisierung der Darpone. Die Kupplungsreaktion der Affigele erfolgte in DMSO, während für Reacti-Gel[®] und CNBr-aktivierte Sepharose[®] eine Carbonatlösung (pH 8,3) mit 25 % Anteil DMF als Kupplungspuffer verwendet wurde. Durch den DMF-Anteil konnte eine Ausfällung der schwerlöslichen Darpone verhindert werden. Es wurden Darponkonzentrationen von 1, 3 und 5 µmol pro mL Trägermaterial-Suspension getestet. Nach Beendigung der Kupplungsreaktion wurden die restlichen aktiven Gruppen durch die Zugabe von Ethanolamin **77** deaktiviert, wobei eine jeweils separat hergestellte Ethanolaminmatrix in den Versuchen als

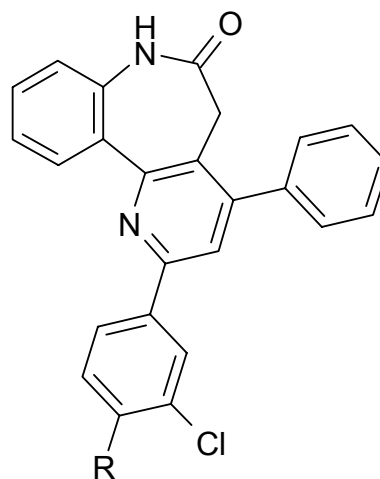
Negativkontrolle diene. Die für die Untersuchungen verwendeten Verbindungen sind in Abbildung 4-4 dargestellt.

Abb. 4-4: Für die Affinitätsuntersuchungen eingesetzten Verbindungen mit Aminobutoxy- bzw. Aminotetraethylenglycollinkern



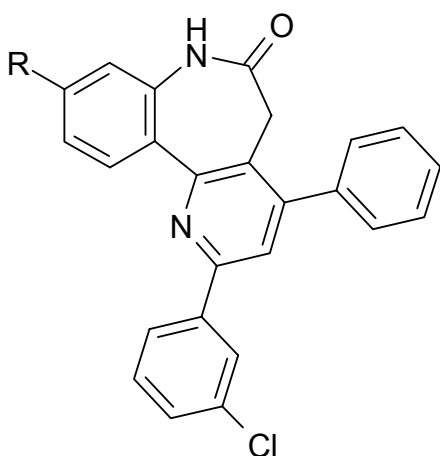
49a R = O(CH₂)₄NH₂

59a R = (OCH₂CH₂)₄NH₂



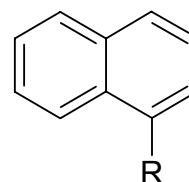
49b R = O(CH₂)₄NH₂

59b R = (OCH₂CH₂)₄NH₂



49c R = O(CH₂)₄NH₂

59c R = (OCH₂CH₂)₄NH₂



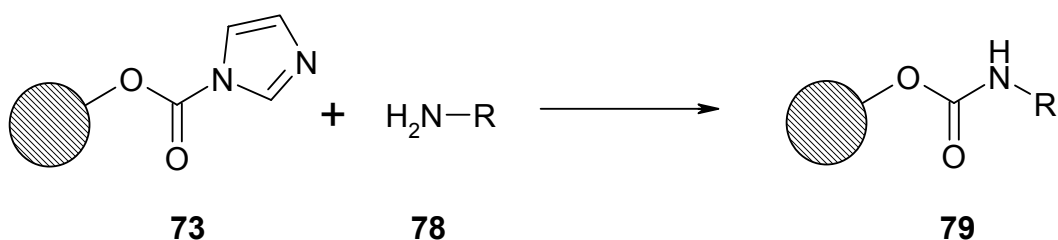
49d R = O(CH₂)₄NH₂

59d R = (OCH₂CH₂)₄NH₂

77 H₂N-CH₂CH₂-OH

Durch die Kupplung von Reacti-Gel® **73** mit primären Aminen **78** erhält man Matrices, bei denen die Aminoverbindung über eine Urethangruppe mit dem Trägermaterial verbunden ist. Die allgemeine Reaktion ist in Schema 4-1 dargestellt.

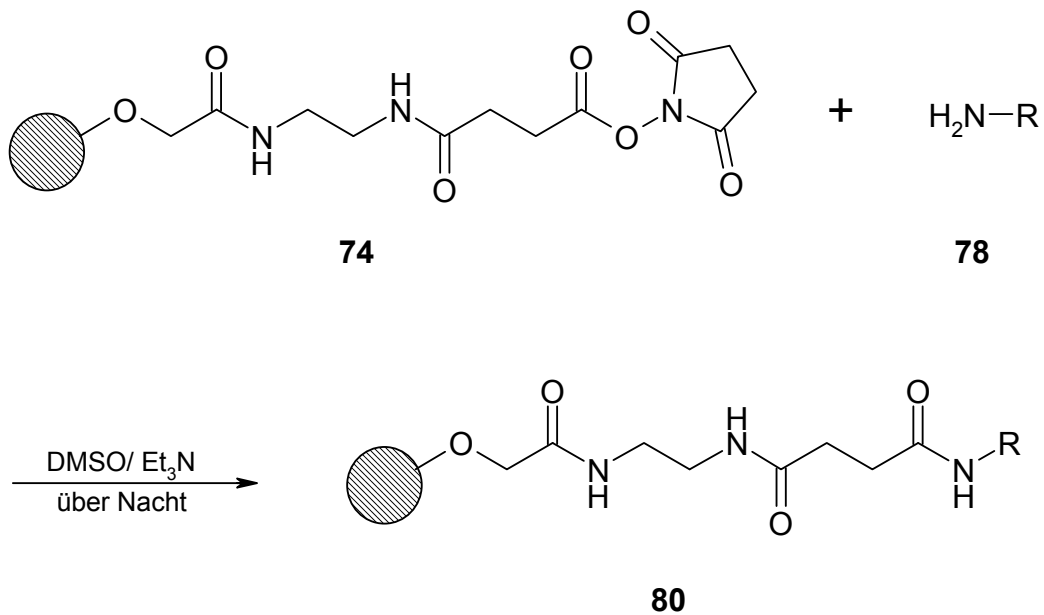
Schema 4-1: Allgemeines Kupplungsschema primärer Amine mit Reacti-Gel®



In von Wieking durchgeführten Affinitätsuntersuchungen konnten mit den aus Paullon **1b** und **1c** erzeugten Reacti-Gel Matrices sehr selektive Proteinbindung nach Inkubation mit Zellextrakten erzielt werden. Versuche, diese Methode auf die Aminoverbindungen **49b,d** und **59b,d** zu übertragen, scheiterten jedoch. So waren nach Inkubation der Matrices mit Zellhomogenaten keine Proteinbanden auf dem Elektropherogramm mittels Silberfärbung zu detektieren.

Für erste orientierende Studien wurden daher die Affigele® 10 und 15 verwendet. Die im Produktnamen enthaltenen Zahlen weisen auf die Anzahl der im Spacer enthaltenen Atome hin, die den Abstand zwischen Ligand und Matrix bilden. Bei der Reaktion von primären Aminen **78** mit den Trägermaterialien kommt es unter Abspaltung von *N*-Hydroxysuccinimid zur Ausbildung von sekundären Amiden. Die allgemeine Reaktion von Affigel® 10 mit primären Aminen ist Schema 4-2 dargestellt. Die aus der Umsetzung von Affigel® 10 mit den Aminodarponverbindung **49a,b,c** und **59b** erhaltenen Matrices **80** sind in Abbildung 4-2 zusammengefasst. Sie erfolgte in Konzentrationen von 3 und 5 µmol Darpon pro ml Trägermaterial. Die Umsetzung von Affigel® 15 **75** erfolgte lediglich mit dem Aminobutoxydarpon **49b** zur Matrix **81** mit einer Konzentration von 5 µmol/mL Trägermaterial (Schema 4-3).

Schema 4-2: Allgemeines Kupplungsschema primärer Amine mit Affigel® 10



Schema 4-3: Allgemeines Kupplungsschema primärer Amine mit Affigel® 15

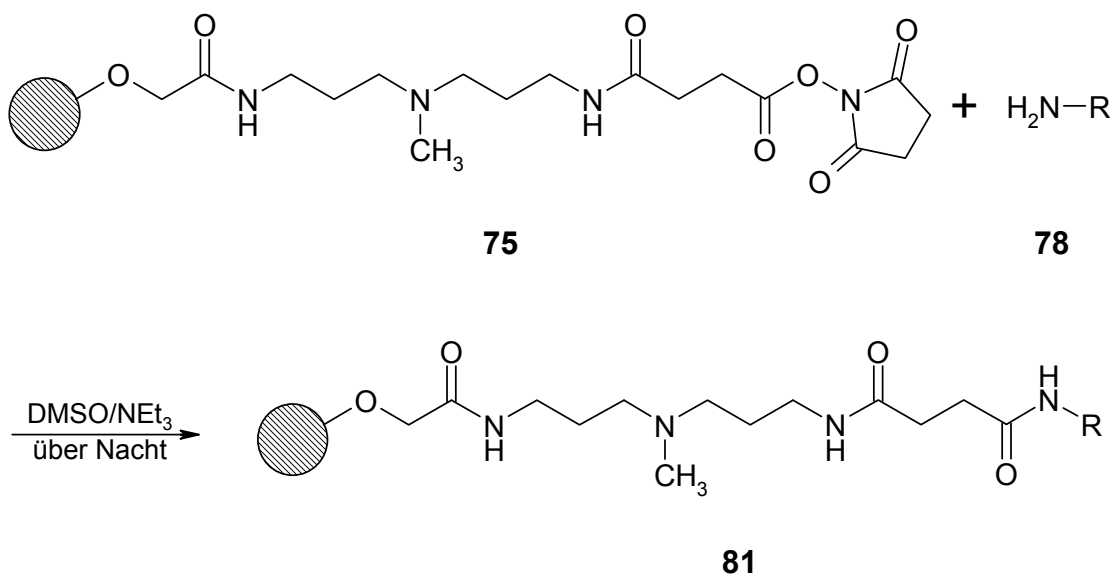


Abb. 4-5: Aus Affigel[®] 10 resultierende Darponmatrices **80a-c** und Matrix **80e**

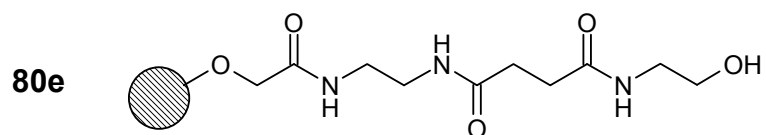
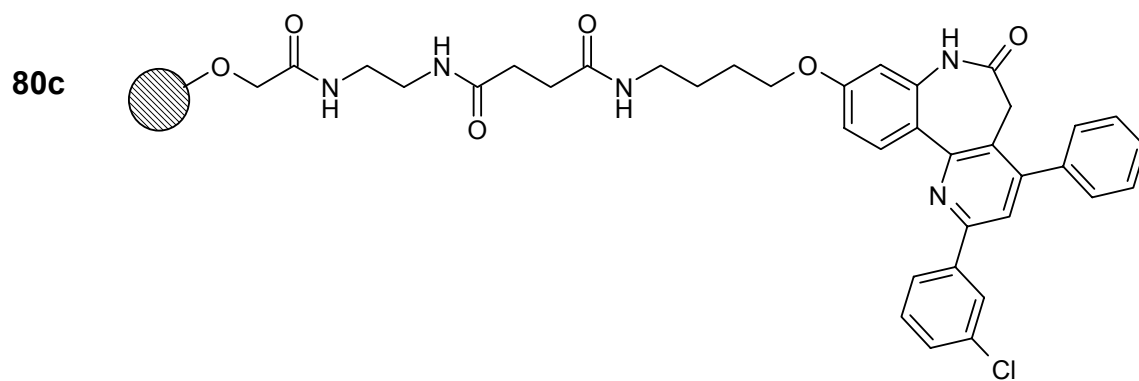
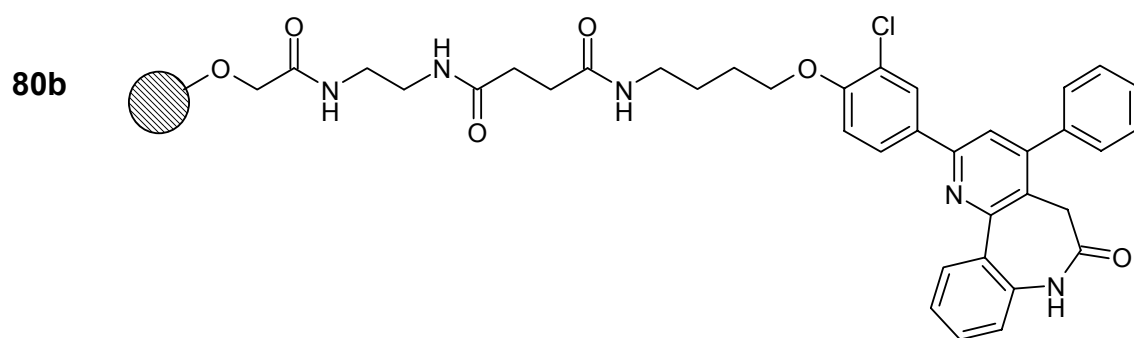
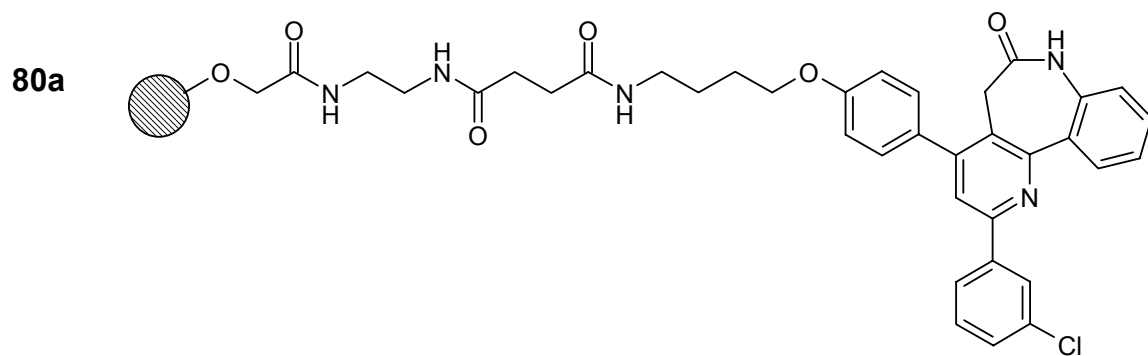
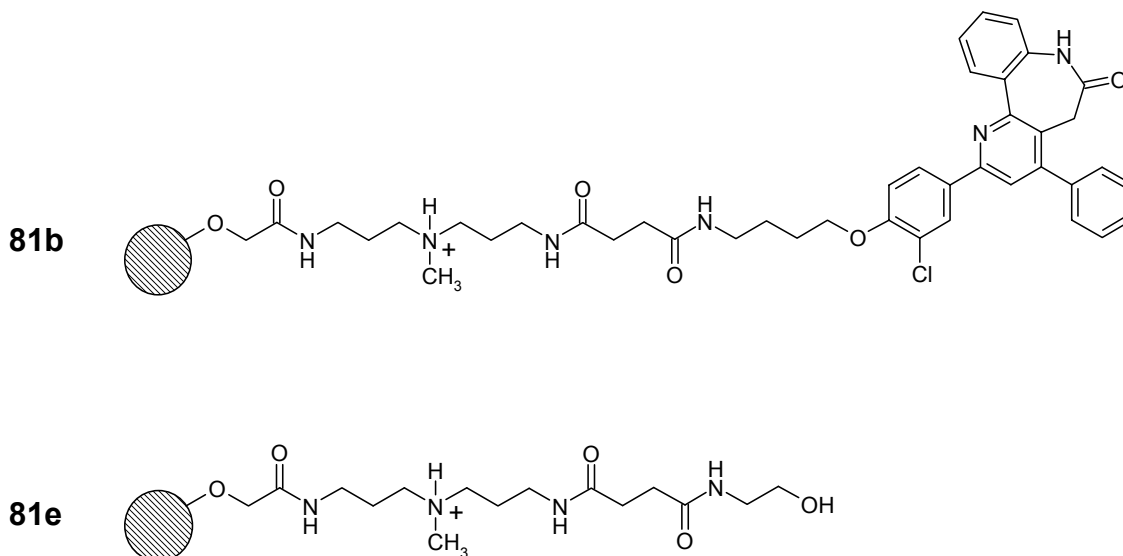
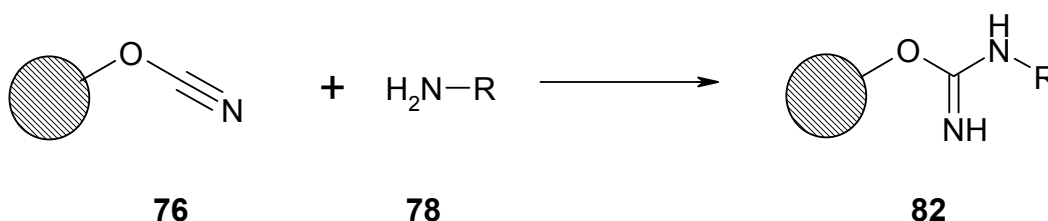


Abb. 4-6: Aus Affigel® 15 resultierende Darponmatrices **81b** und Matrix **81e**



Der Hauptteil der Affinitätsuntersuchungen erfolgte unter Verwendung von Cyanbromid-aktivierter Sepharose® 4B in Konzentrationen von 1, 3 und 5 μmol Darpon pro mL Trägersubstanz. Die Kupplungsreaktion erfolgt in Carbonatpuffer (pH 8,3) mit einem 25%igem Anteil an DMF. Wie in dem allgemeinen Schema 4-4 dargestellt ist, reagiert die Cyanatgruppe primären Aminoverbindungen **78** zum Isoharnstoffderivat **82**.

Schema 4-4: Reaktion von Cyanbromid-aktivierter Sepharose® mit primären Aminen



Die hergestellten Sepharosematrices mit Butoxylinker **82** sowie solche mit Tetraethylglycollinker **83** sind in den Abbildungen 4-7 und 4-8 dargestellt.

Abb. 4-7: Aus Umsetzung von Cyanbromid-aktivierter Sepharose[®] mit den Butoxyverbindungen **49a-d** und **77** hervorgehende Matrices

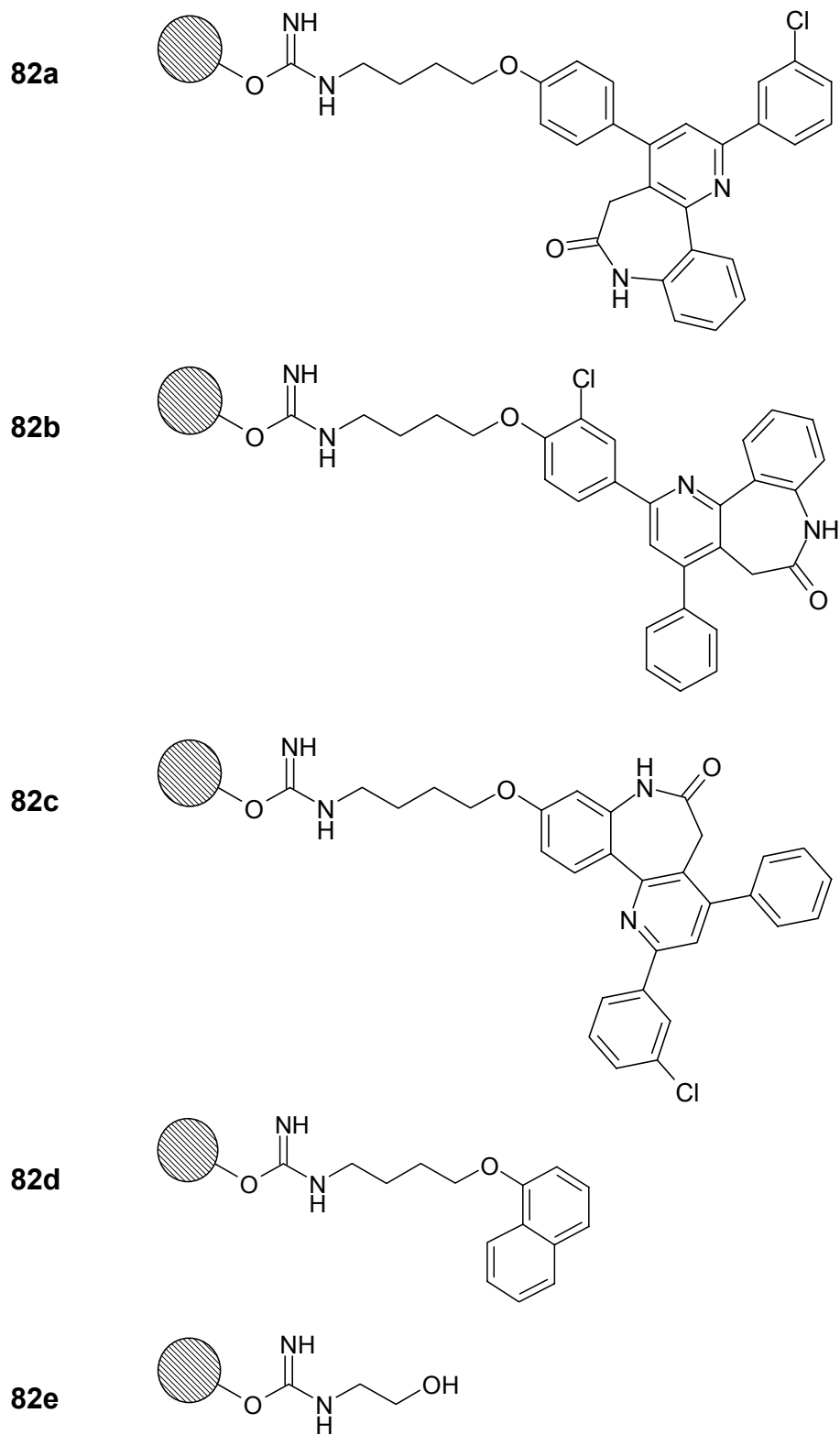
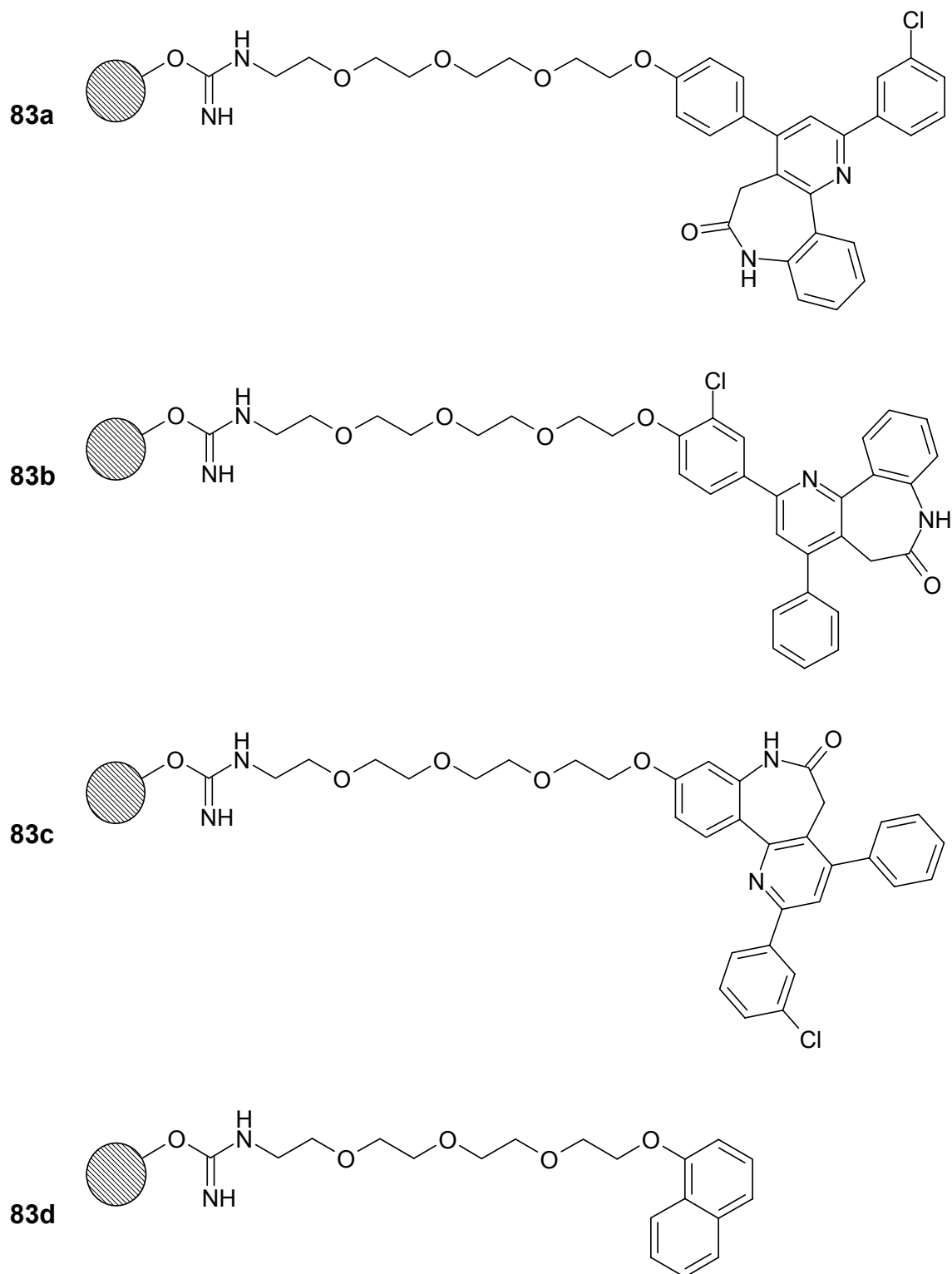


Abb. 4-8: Aus Umsetzung von Cyanbromid-aktivierter Sepharose® mit den Tetraethylenglycolverbindungen **59a-d** hervorgehende Matrices



4.4.3 Inkubation mit Zell- und Gewebeextrakten

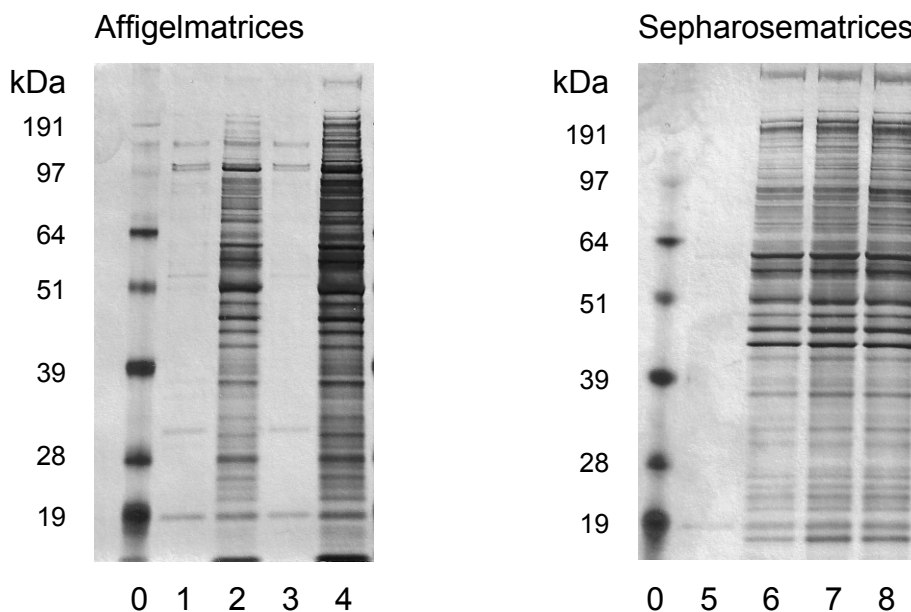
In den orientierenden Affinitätsuntersuchungen mit den oben beschriebenen Darpon-Matrices wurden Seesternooocyten-, Schweinehirn- und Hefeextrakte verwendet. Anhand dieser Experimente sollte ein geeignetes System ermittelt werden, welches eine spezifische Bindung von Proteinen sowie deren Isolierung und Identifizierung ermöglicht. Neben der Wahl des optimalen Trägermaterials wurde der Einfluss der Darponkonzentration und der Darponlinker auf die Protein-Wechselwirkungen untersucht. Im ersten Abschnitt der Untersuchungen standen lediglich die Darpone mit dem Butoxylinker **82a-c** und **82e** zur Verfügung. Im zweiten Teil kamen auch die Darpone **83a-c** mit Tetraethylenglycollinkern, sowie die Naphtholverbindungen **82d** und **90d** zum Einsatz. Die aus den Vorexperimenten gewonnenen Erkenntnisse sollten dann auf die Untersuchung von humanen Zell- und Tumorzell-Homogenaten übertragen werden, die besonders stark durch Darpone gehemmt werden.

4.4.3.1 Inkubation mit Seesternooocytenextrakt

Die Untersuchungen mit Seesternooocytenextrakt wurden mit den Matrices durchgeführt, die aus der Umsetzung mit den Aminobutoxydarponen **49** erhalten worden waren. Zum Vergleich der Affigel® 10 und Affigel® 15 Eigenschaften wurden Matrix **80b** und **81b** mit einer jeweiligen Ligandenkonzentration von 5 µmol Darpon pro Milliliter Trägermaterial mit dem genannten Zellhomogenat inkubiert. Die verwendete Proteinkonzentration lag bei 3 mg/10 µl Matrix. Als Referenz dienten ein Standardprotein-Marker sowie die jeweiligen Ethanolaminmatrices **80e** und **81e**. Nach Aufarbeitung und Entwicklung mittels SDS-PAGE wurden die erhaltenen Proteinbanden beider Matrices durch Silberfärbung entwickelt. Für beide Matrices wurde eine Vielzahl von Proteinbindungen beobachtet (Abbildung 4-9, links). Die Bandenintensitäten der Affigel10-Darponmatrix **80b** fällt dabei deutlich geringer aus als bei der Affigel15-Darponmatrix **81b**. Eine Identifizierung und Isolierung einzelner Proteine aus dem Seesternooocytenextrakt erschien aufgrund der

Vielzahl der beobachteten Banden mit keiner der Affigel-Matrices sinnvoll. Als Alternative zu den Affigelen wurden die Sepharosematrices **82a-c** unter gleichen Bedingungen mit Seesternocytenextrakt inkubiert. Die Bandenintensitäten fielen ähnlich stark wie bei der Affigel10-Darponmatrix aus. Die Bandenmuster der drei Matrices waren jedoch trotz der unterschiedlichen Anbindungsstellen der immobilisierten Darpone stets gleich, weshalb eine selektive Bindung der Proteine an die Liganden unwahrscheinlich erschien (Abbildung 4-9, rechts). Aufgrund dieser Tatsache sollten für weiterführende Untersuchungen andere Zellhomogenate verwendet werden.

Abb. 4-9: Silberfärbung nach Inkubation der Affigel- sowie Sepharosematrices mit Seesternocytenextrakt



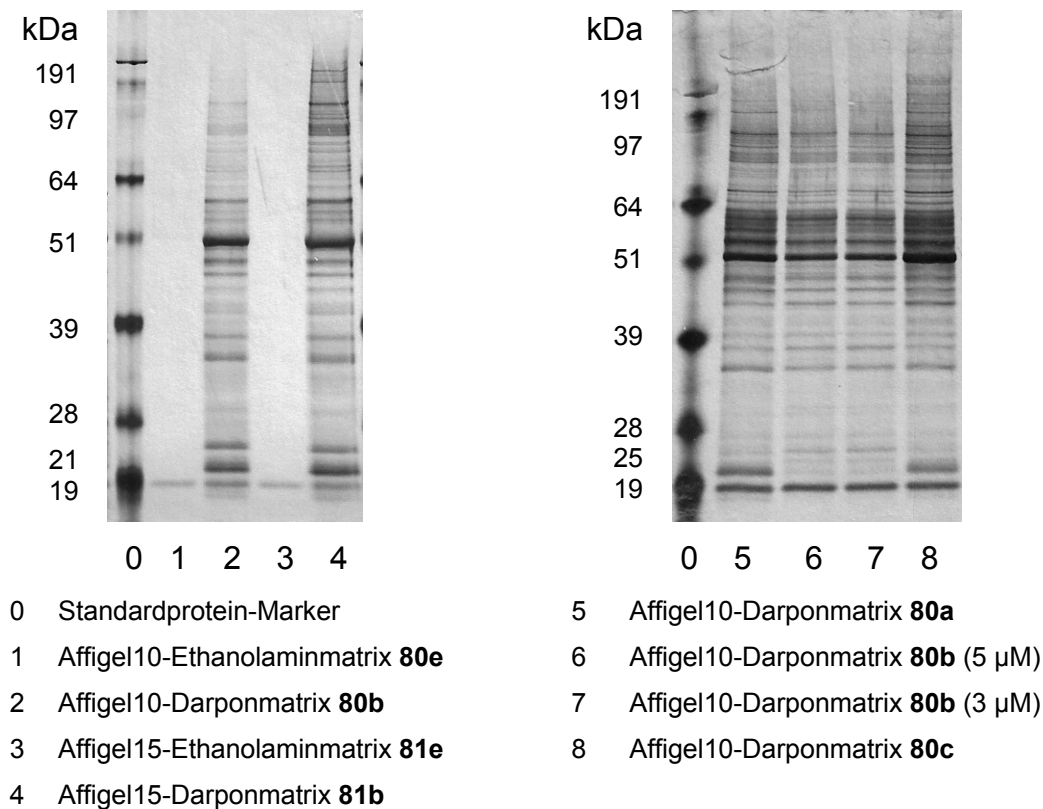
Ligandenkonzentration (Darponverbindung pro Milliliter Trägermaterial); Affigelmatrices: 5 μ M/ml; Sepharosematrices: 3 μ M/ml; Proteinkonzentration des Extraktes: 3 mg /10 μ l Matrix.

- | | | | |
|---|--|---|--|
| 0 | Standardproteinmarker | 5 | Sepharose-Ethanolaminmatrix 82e |
| 1 | Affigel10-Ethanolaminmatrix 80e | 6 | Sepharose-Darponmatrix 82a |
| 2 | Affigel10-Darponmatrix 80b | 7 | Sepharose-Darponmatrix 82b |
| 3 | Affigel15-Ethanolaminmatrix 81e | 8 | Sepharose-Darponmatrix 82c |
| 4 | Affigel15-Darponmatrix 81b | | |

4.4.3.2 Inkubation und Untersuchungen mit Schweinehirnextrakt

Die Untersuchungen mit Schweinehirnextrakt wurden zunächst in analoger Weise zu den in 4.4.3.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 4-10, links). Der Vergleich der Affigelmatrices **80b** und **81b** ergab wiederum eine intensivere Proteinbindung für Affigel 15, bei generell hoher Bandenanzahl. Da diese jedoch nicht so extrem wie bei dem Seesternocytenextrakt ausfiel, wurden alle Affigel10-Darponmatrices mit Schweinehirnextrakt inkubiert. Die Ligandenkonzentration wurde dafür von 5 auf 3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ reduziert und zum Vergleich Affigel10-Darponmatrix **80b** mit beiden Konzentrationen inkubiert.

Abb. 4-10: Silberfärbung nach Inkubation mit Schweinehirnextrakt

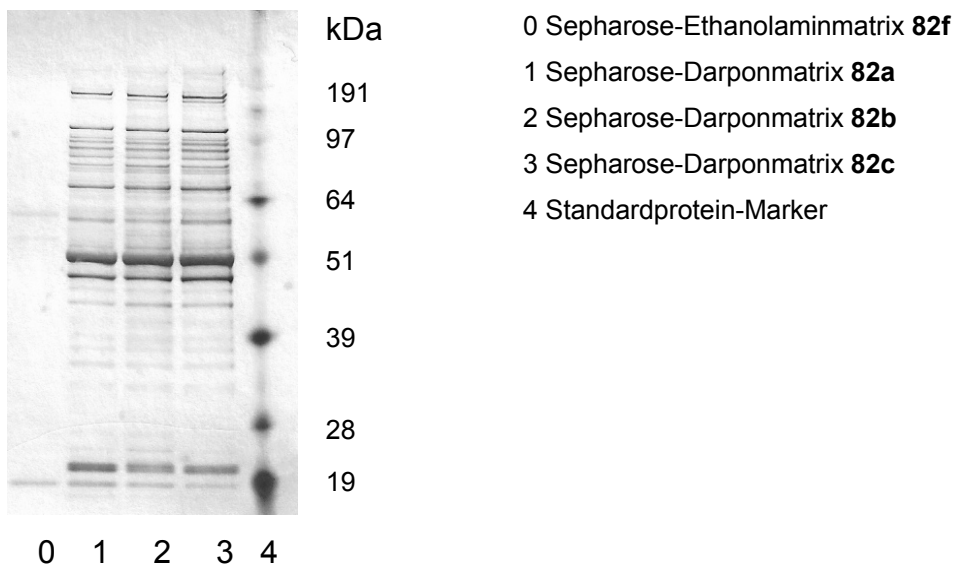


Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial); Links: Affigel10- und Affigel15-Matrix 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$; Rechts Affigel10-Matrices 3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ mit Ausnahme von Reihe 6 (5 $\mu\text{M}/\text{ml}$); Proteinkonzentration des Extraktes: 3 mg /10 μl Matrix.

Das Ergebnis (Abbildung 4-10, rechts) ließ für die beiden Konzentrationen der Matrix **80b** keine Unterschiede in der Bandenintensität erkennen. Ungeklärt war eine Bande bei ca. 21 kDa nicht mehr zu detektieren, die noch im Vorversuch und bei **80a** und **80c** erschien. Dagegen wiesen Reihe 6 und 7 (**80b**) bei ca. 25 kDa eine Proteinbande auf, die in Matrix **80a** und **80c** schwächer ausgeprägt war. Während dieses als ein Indiz für eine spezifische Proteinbindung interpretiert werden kann, wiesen die übrigen Proteinbanden der drei Matrices ein annähernd gleiches Muster auf.

Die unspezifischen Proteinbindungen erforderten die Umstellung auf ein anderes Matrixsystem. Der Schweinehirnextrakt wurde daher mit Hilfe der Sepharosematrices **82** untersucht. Das Resultat in Abbildung 4-11 deutete besonders im Bereich zwischen 97 und 191 kDa auf wesentlich weniger unspezifische Wechselwirkungen der Proteine mit den Matrices hin.

Abb. 4-11: Silberfärbung nach Inkubation der Sepharosematrices **82** mit Schweinehirnextrakt

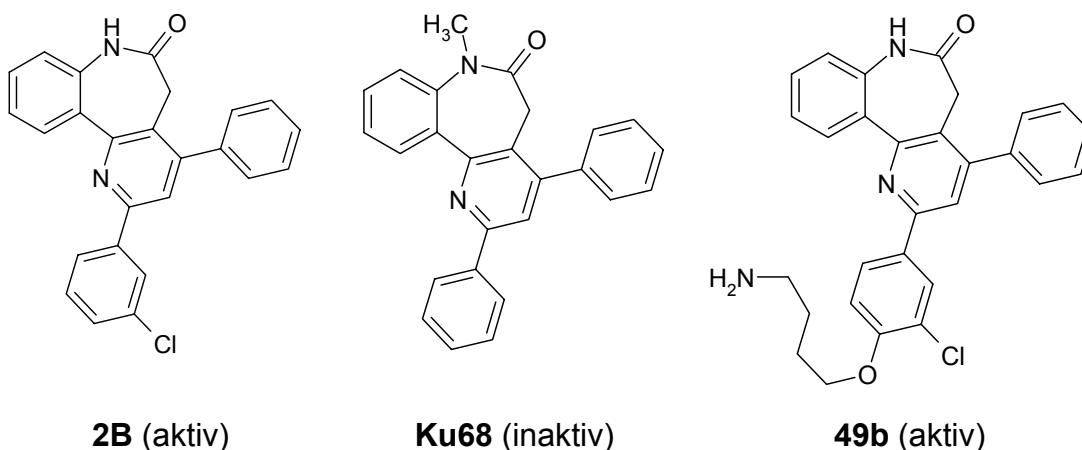


Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial); 3 μ M/ml; Proteinkonzentration des Extraktes: 3 mg /10 μ l Matrix

Trotz der verbesserten Auflösung, die durch die Verwendung der Sepharosematrices erzielt werden konnte, war es zunächst notwendig, Kriterien für die Unterscheidung von unspezifischen und spezifischen Signalen zu formulieren. Dafür wurden die Untersuchungen mit Gewebehomogenaten durchgeführt, die mit der Darpon-Leitstruktur **2B**, sowie mit anderen nicht immobilisierten Darponen behandelt worden waren (siehe Abbildung 4-12). Diese Vorbehandlung sollte dazu dienen, in den Extrakten spezifische Darpon-Bindungsstellen zu belegen. Würde es im Vergleich zum unbehandelten Extrakt zu Signalabschwächung oder gar zu kompletten Bandenlöschungen kommen, hätte dies als Indiz für eine selektive Bindung zu den immobilisierten Darponen gewertet werden können.

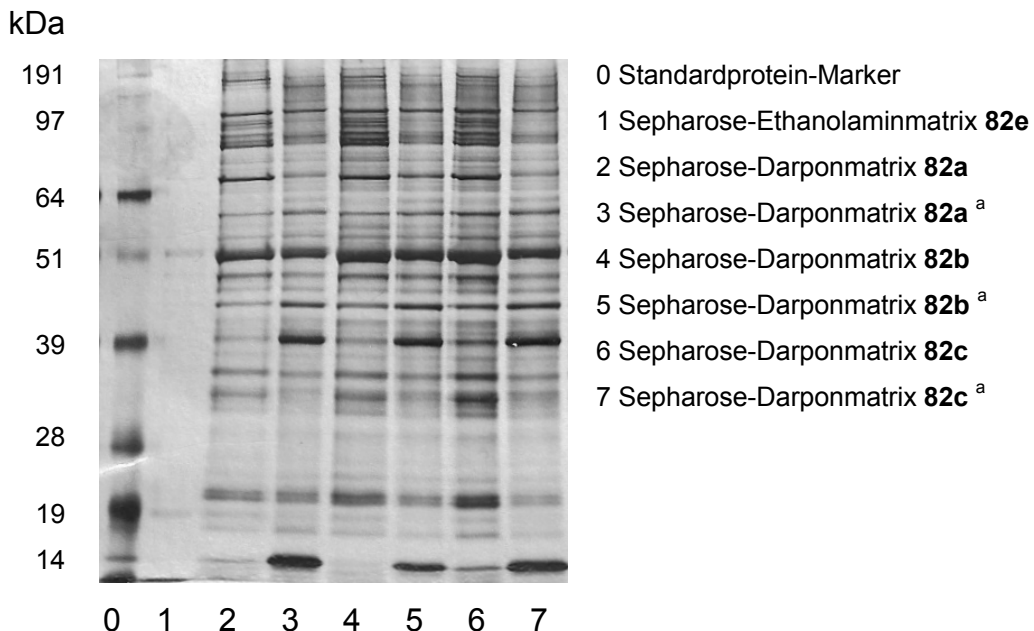
Die Testserien wurden mit der Sepharose-Darponmatrix **82b** unter Verwendung von Schweinehirnextrakt durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten zum einen das unbehandelte Zellhomogenat und zum anderen ein mit der inaktiven Verbindung **Ku68** vorbehandelter Extrakt. Des Weiteren wurde in den Versuchsreihen das freie Darpon **49b** als aktive Verbindung für die Vorinkubation verwendet. Die Ergebnisse der SDS-PAGE erlaubten jedoch, bedingt durch das starke „Hintergrundrauschen“ der unspezifischen Proteinbindungen, keine Identifizierung signifikanter Signalauslösungen im Vergleich zu den Referenzmatrices.

Abb. 4-12: Darponverbindungen für die Vorinkubation mit Zellhomogenaten



In einer Abwandlung dieser Versuchsreihe wurden die nach einer Vorinkubation mit Darponmatrix erhaltenen Schweinehirnextrakte erneut mit einer äquivalenten Menge Matrix gleicher Ligandenanbindungsstelle inkubiert. Als Ergebnis sollten Proteinbanden, die spezifischen Ligandenbindungen unterliegen, abgeschwächt werden, da sie im ersten Vorgang bereits von der Matrix adsorbiert worden wären. Unspezifische Bindungen würden dagegen relativ unbeeinflusst bleiben. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen waren jedoch nicht eindeutig. Einerseits kam es in Bereichen zwischen 64 und 97 kDa zu einer Reduktion von Signalintensitäten, andererseits verstärkten sich Banden bei 14 und bei 39 kDa gegenüber der einfach inkubierten Referenzmatrix. Eine Aussage über Darpon-affine Banden war aufgrund vielfältiger unspezifischer Proteinbindungen auch in diesem Fall nicht möglich.

Abb. 4-13: Ergebnisse der Versuche mit Vorinkubation der Schweinehirnextrakte durch Darponmatrices (Silberfärbung)



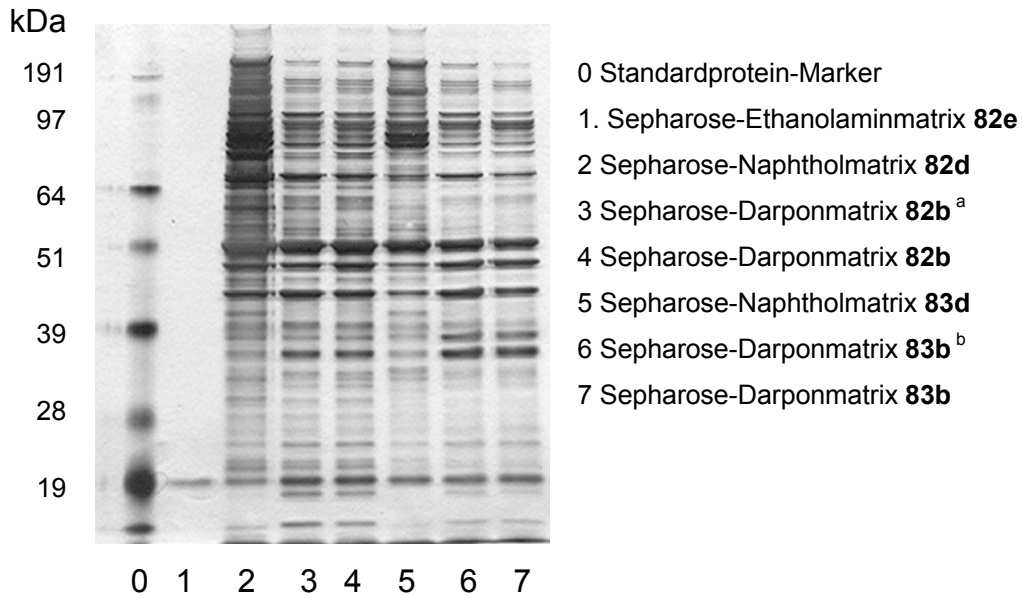
^a der verwendete Extrakt wurde 30 min mit der Darponmatrix vorbehandelt und der Überstand nach Zentrifugieren erneut mit Matrix gleicher Ligandenanbindungsstelle inkubiert. Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial): 3 µM/ml; Proteinkonzentration des Extraktes: 3 mg /10 µl Matrix.

Die Schwierigkeiten aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit lipophilen Proteinen verhinderte bei der Verwendung der aus Aminobutoxydarponen **49** hergestellten Matrices eine eindeutige Identifizierung charakteristischer Banden. Diese Probleme konnten auch durch die Verwendung unterschiedlicher Trägermaterialien, Darponkonzentrationen und Waschpufferlösungen, sowie Vorinkubation der Zellhomogenate durch Matrices oder freie Darpone nicht gelöst werden.

Im zweiten Abschnitt der Untersuchungen wurde deshalb versucht, durch die Verwendung des Tetraethylenglycollinkers die unspezifischen Proteinbindungen der Darpone zu vermindern. Die hydrophilen Eigenschaften und der vergrößerte Abstand vom Liganden zur Matrix im Vergleich zum Butoxylinker ließen eine geringere Auswirkung der Wechselwirkungen erhoffen. Darüber hinaus sollten Experimente mit den hergestellten Naphtholmatrices Aufschluss über das Ausmaß der lipophilen Proteinbindung mit immobilisierten aromatischen Systemen bringen.

Hierfür erfolgte zunächst der Vergleich der Naphtholmatrices mit den Darponmatrices aus der **b**-Reihe, deren Anbindungsstelle sich am 2-Phenylrest befindet. Die Naphtholmatrices **82d** und **83d** (3µM/ml Trägermaterial) wurden mit Schweinehirnextrakt 30 min inkubiert und die nach Zentrifugation erhaltenen Überstände auf die Darponmatrix **82b**, bzw. **83b** gegeben. Nach einer erneuten Inkubation wurden die aufbereiteten Proben gegen die nicht vorbehandelten Referenzen der Darponmatrices entwickelt. Am Ergebnis der Silberfärbung ist zu erkennen, dass die Naphtholmatrices sehr viele unspezifische, lipophile Wechselwirkungen mit Proteinen aller Größenklassen eingehen. Die Butoxynaphtholmatrix **82d** erscheint bei gleicher Extraktkonzentration sehr viel stärker beladen zu sein als die mit dem Polyoxyethylenglycollinker. Bei den Darponmatrices ist das gleiche Phänomen zu beobachten. Besonders im Bereich zwischen 64 und 51 kDa kommt es durch die Verwendung des hydrophilen Linkers zu wesentlich weniger unspezifischen Wechselwirkungen (siehe Abbildung 4-14).

Abb. 4-14: SDS-PAGE der aus Schweinehirn extrahierten Proteine mit und ohne Vorinkubation mit Naphtholmatrices (Silberfärbung)



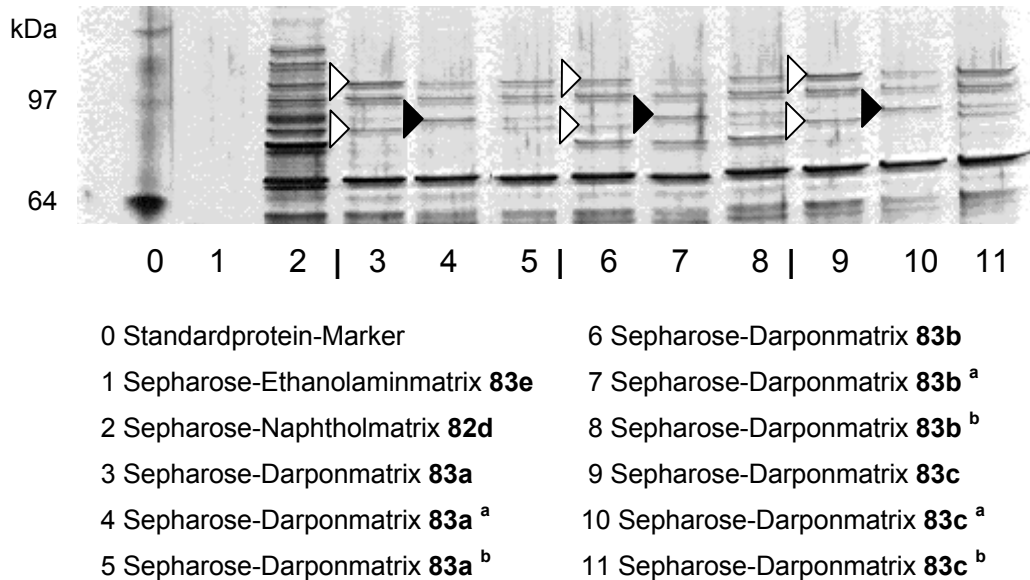
^a Der verwendete Extrakt wurde 30 min mit Matrix **82d** vorbehandelt und der Überstand nach Zentrifugieren erneut mit Matrix **82b** inkubiert. ^b Der verwendete Extrakt wurde 30 min mit Matrix **83d** vorbehandelt und der Überstand nach Zentrifugieren mit Matrix **82b** inkubiert. Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial): 3 µM/ml; Proteinkonzentration des Extraktes: 3 mg /10 µl Matrix.

Der Versuch, die Naphtholmatrix als Mittel zur Abtrennung störender lipophiler Proteine zu verwenden, war nicht erfolgreich, da sich die vorinkubierten Banden nicht merklich von den unbehandelten Referenzen unterschieden. In weiteren Experimenten wurden mehrere hintereinander geschaltete Vorinkubationsschritte mit Naphtholmatrices durchgeführt, was jedoch lediglich zur unspezifischen Abtrennung fast aller Proteine führte.

Die Verwendung der Naphtholmatrices ermöglichte dennoch eine grobe Differenzierung zwischen spezifisch und unspezifisch gebundenen Proteinen. Ist eine Proteinbande in der Darponmatrix zu detektieren, die in der Naphtholmatrix fehlt, so ist dies ein Hinweis darauf, dass diese nicht auf unspezifischen Wechselwirkungen aromatischer Systeme beruht. Erscheint eine Bande dagegen in beiden Matrices, kann eine spezifische Bindung durch den Darponliganden zwar nicht ausgeschlossen werden, eine lipophile Wechselwirkung der aromatischen Reste mit Proteinen ist in diesem Fall jedoch wahrscheinlicher.

Die Resultate des Tetraethylenglycollinkers waren trotz verbesserter Spezifität jedoch nicht dazu geeignet, Banden aus dem Gel für die Proteinidentifikation zu isolieren. Für die folgenden Untersuchungen wurden daher Zellhomogenate verwendet, die vor der Inkubation mit den Matrices über 1 h bei 10^6 rpm zentrifugiert wurden. Mit den so behandelten Schweinehirnextrakten wurden die bereits für die Butoxydarpon-Matrices vorgestellten Versuche mit Vorinkubation durchgeführt. Jede Matrix der Tetraethylenglycol-Reihe wurde dafür mit einem Extrakt inkubiert, der die Darponleitstruktur **2B**, bzw. die inaktive N-Methylverbindung **Kun68** (siehe Abbildung 4-12) enthielt. Als Referenz wurden die entsprechenden unbehandelten Extrakte, sowie Naphthol- und Ethanolaminmatrix verwendet. In dem vergrößerten Teilausschnitt (siehe Abbildung 4-15) konnten für jede Ligandenanbindungsstelle zwei Banden beobachtet werden, die bei Zugabe des aktiven Darpons **2B** annähernd verschwanden und in der Negativkontrolle (Vorinkubation mit inaktivem Darpon **Kun68**) wieder erschienen. Daneben gab es wiederum Signale, die sich durch Zugabe der DMSO-Lösung von **2B** extrem verstärkten. Da diese Intensivierungen in weniger ausgeprägter Form auch bei der Lösung des **Kun68** feststellbar waren, wurde dies als ein Effekt des Lösungsmittels DMSO gedeutet.

Abb. 4-15: Vorinkubations-Studien mit Darpon **2B** und **Kun68** an Sepharose-Darponmatrices (Silberfärbung, Ausschnittsvergrößerung)



^a Der verwendete Extrakt wurde mit aktivem Darpon **2B** vorbehandelt (10 µl, 10 mM in DMSO). ^b Der verwendete Extrakt wurde mit inaktivem Darpon **Kun68** vorbehandelt (10 µl, 10 mM in DMSO). Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial): 3 µM/ml; Proteinkonzentration des Extraktes (ultrazentrifugiert): 1 mg /10 µl Matrix. ▷ Signale, die nach Zugabe von **2B** verschwinden (Reihe 4, 7 und 10), nach Zugabe von **Kun68** jedoch erhalten bleiben. ► Signale, die sich nach Zugabe von **2B** deutlich und bei **Kun68** mäßig verstärken.

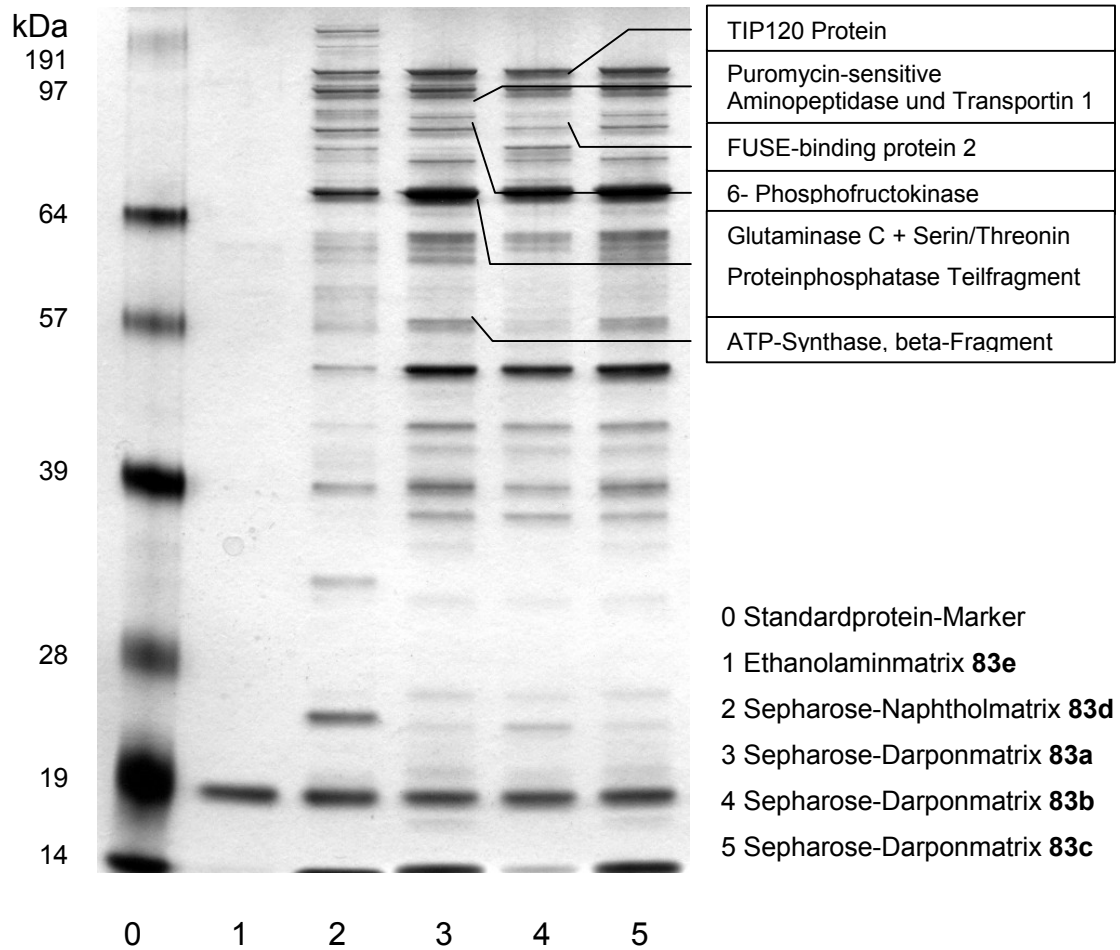
Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Paullonen lag die Vermutung nahe, dass Darpone ebenfalls kompetitive ATP-Proteinkinase-Inhibitoren darstellen könnten. In diesem Fall würde der Zusatz einer hohen ATP-Konzentration während der Inkubation mit einem Zellhomogenat den Darponliganden aus seiner Bindungsstelle in den affinen Enzymen verdrängen, welches eine Signalminderung zufolge hätte. Durch Affinitätsuntersuchungen mit immobilisiertem *R*-Roscovitin **61** gelang Bach et al. beispielsweise eine ATP-Konzentrations-abhängige Verminderung von Signalen des Roscovitin-affinen Proteins CDK-5.⁵⁷ Bei Experimenten mit Darponmatrices wurde ein Teil der Proben mit einer ATP-Endkonzentration von 10 mM inkubiert. Im Vergleich zu den Referenzmatrices waren jedoch keine signifikanten Bandenlöschungen zu detektieren.

Anhand der durchgeführten Voruntersuchungen konnten nun Kriterien für die Isolierung von Proteinbanden formuliert werden. Die Proteinbanden, die für die Isolierung und Zuführung zur Proteinanalytik in Frage kommen, sollten mindestens eins der drei folgenden Kriterien erfüllen:

- Signalminderung durch Zugabe einer Lösung des aktiven Darpons **2B**
- Bandenmuster unterscheidet sich von dem anderer Liganden-anbindungsstellen
- Bandenmuster unterscheidet sich deutlich von dem der Naphtholmatrix

Für die Isolierung von Schweinehirn gewonnenen Proteinbanden wurden alle Sepharose-Tetraethylenglycol-Darponmatrices mit ultrazentrifugiertem Extrakt inkubiert und im Anschluss an die SDS-PAGE mit Coomassie-Blau entwickelt. Bei dem Umgang mit dem Gel ist auf das Tragen geeigneter Schutzkleidung zu achten, um eine Kontamination mit Partikeln, insbesondere Keratin, zu vermeiden. Ein parallel aus den gleichen Proben parallel entwickeltes Gel wurde mit Silberfärbung entwickelt und dient zur Veranschaulichung der isolierten Gelbanden, die aus dem Coomassie-Gel geschnitten und für die Proteinanalytik ausgewählt wurden (siehe Abbildung 4-16). Dieses geschah in Abhängigkeit von der Trennschärfe und Visualisierbarkeit der erhalten Signale.

Abb. 4-16: Identifizierte Proteinbanden, die aus der Coomassie-Blaufärbung des ultrazentrifugierten Schweinehirnextrakts isoliert wurden. Als Vergleich diente ein parallel entwickeltes Gel nach Silberfärbung

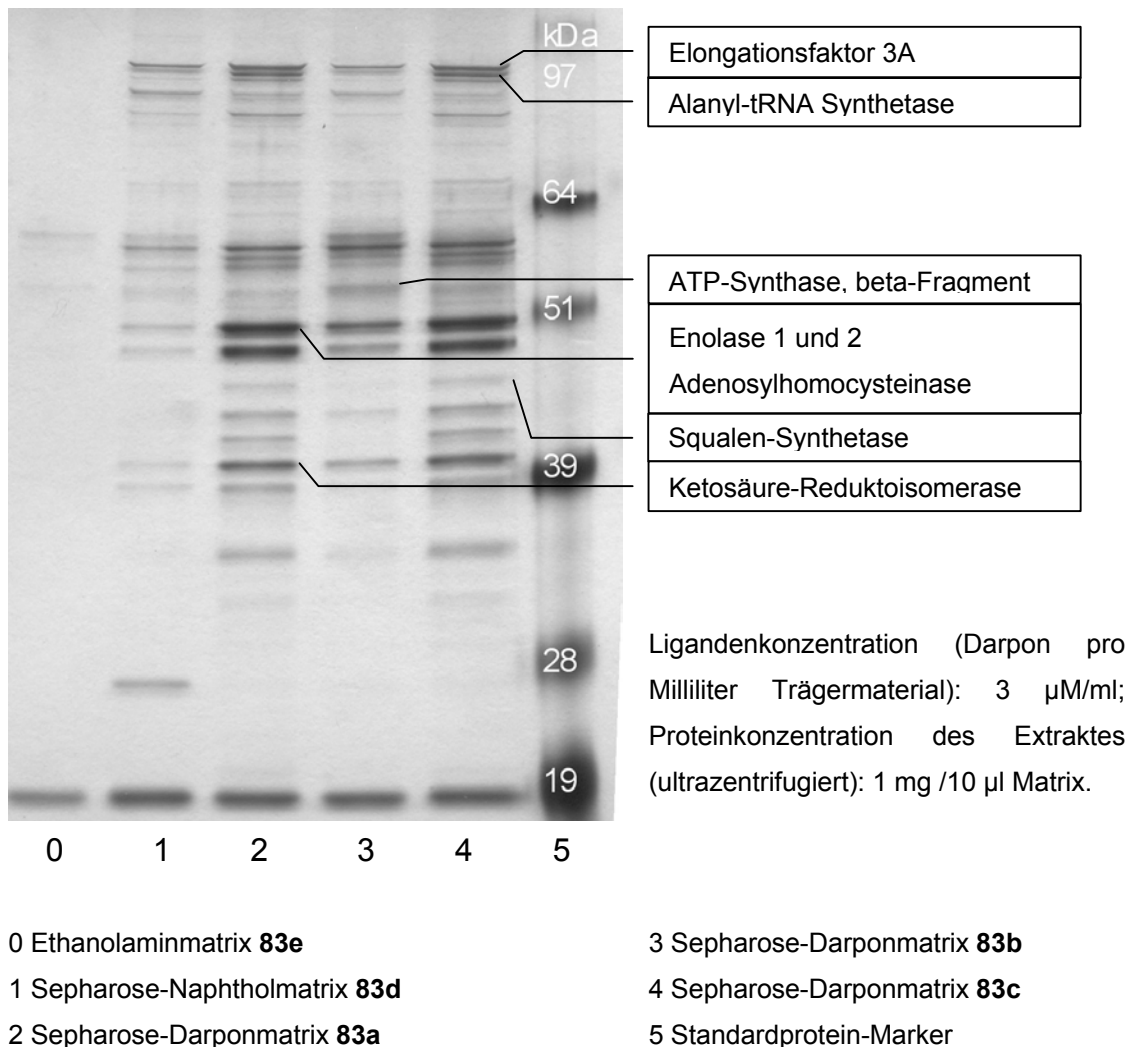


Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial): 3 $\mu\text{M}/\text{ml}$; Proteinkonzentration des Extraktes (ultrazentrifugiert): 1 mg /10 μl Matrix. Die Erklärung der Abkürzungen in den Proteinennamen erfolgt in Kapitel 5.2.

4.4.3.3 Inkubation mit Hefezelleextrakt

Die Arbeiten mit Hefezelleextrakt wurden ausschließlich mit dem an Schweinehirnextrakt erprobten System durchgeführt. In den Hemmtests mit aktiver Darponverbindung **2B** konnte lediglich die Löschung eines Signals bei ca. 97 kDa der Sepharose-Darponmatrix **83b** detektiert werden. Die Isolierung der Proteinbanden des Hefezelleextrakts geschah mittels des unter 4.4.3.2 beschriebenen Verfahrens.

Abb. 4-17: Identifizierte Proteinbanden, die aus der Coomassie-Blaufärbung des ultrazentrifugierten Hefezelleextrakts isoliert wurden. Als Vergleich diente ein parallel entwickeltes Gel nach Silberfärbung

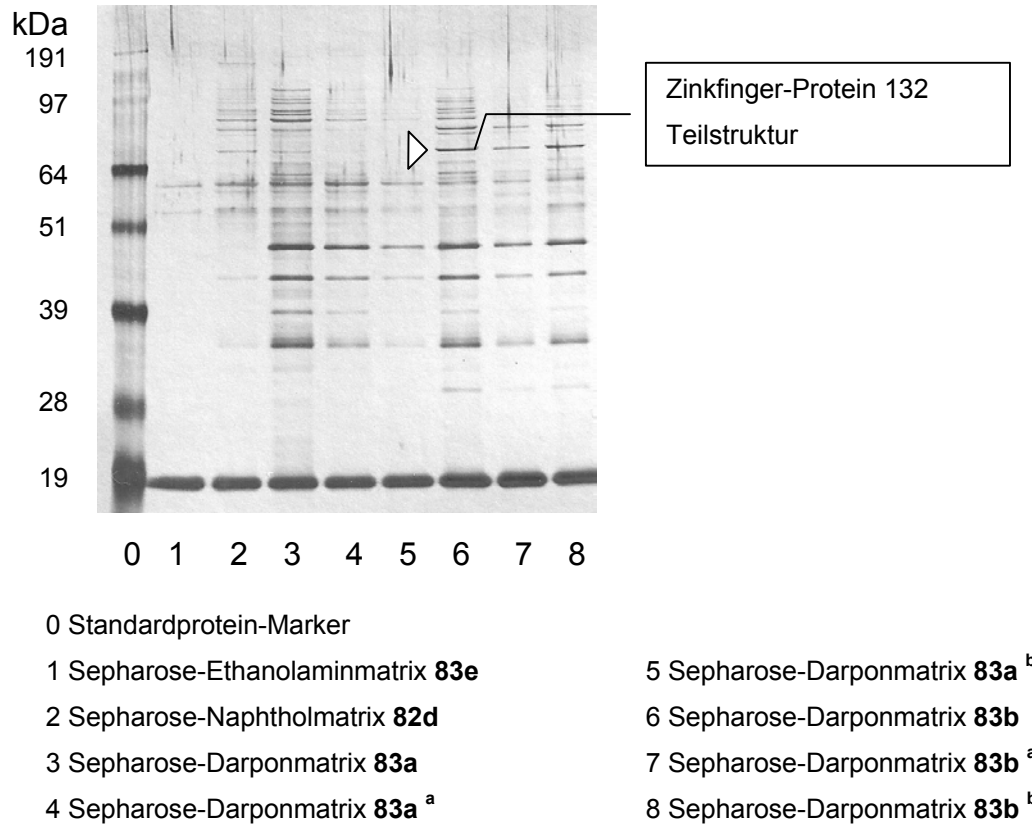


4.4.3.4 Inkubation mit Humanzellextrakten

Für Untersuchungen mit menschlichen Zellhomogenaten wurden Extrakte von HEK-293 (human embryonic kidney cell line) und HG (human gamete cells) verwendet. Ein Problem bei der Verwendung von Material humaner Herkunft ist die relativ aufwändige Anzucht der Zellkulturen und die niedrigen Proteinkonzentrationen der daraus resultierenden Extrakte. Die Verfügbarkeit des Zellmaterials stellte bei den durchgeführten Untersuchungen den limitierenden Faktor dar.

Erste Experimente ergaben für HEK-293 ähnlich starke Bandenintensitäten wie bei allen vorherigen Affinitätsuntersuchungen, weshalb Vorinkubationen mit freien Darponen durchgeführt wurden. Bei diesen wurde auf die Verwendung der Darponmatrix **83c** verzichtet, da die bislang beobachteten Bandenmuster denen der Darponmatrix **83a** sehr stark ähnelten und wenig biologisches Material zur Verfügung stand. Die Ergebnisse waren leider nur bedingt aussagekräftig, da nach Inkubation mit aktivem und inaktivem Darpon Signallöschungen vieler Banden beobachtet werden konnten (siehe Abbildung 4-18). Bei 68 kDa war eine Bande der Darponmatrix **83b** zu erkennen, die bei Darponmatrix **83a** und Naphtholmatrix **83d** nur in sehr schwach ausgeprägter Form vorkam und darüber hinaus einer leichten Darpon-induzierten Signalminderung unterlag. Die Isolierung und Identifizierung dieser Bande erfolgte mittels des Coomassie-gefärbten Gels als Teil des Zinkfinger-Proteins 132.

Abb. 4-18: Identifizierte Proteinbande, die aus der Coomassie-Blaufärbung des ultrazentrifugierten HEK-Extrakts isoliert wurde. Als Vergleich die Silberfärbung der Hemmtests mit freien Darponen.



^a Der verwendete Extrakt wurde mit aktivem Darpon **2B** vorbehandelt (10 µl, 10 mM in DMSO).

^b Der verwendete Extrakt wurde mit inaktivem Darpon **Kun68** vorbehandelt (10 µl, 10 mM in DMSO). Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial): 3 µM/ml; Proteinkonzentration des Extraktes (ultrazentrifugiert): 1 mg /10 µl Matrix. ▷ Signal, das bei Zugabe von **2B** vermindert wird, bei Zugabe von **Kun68** jedoch erhalten bleibt

Die Untersuchung des HG-Extrakts ergab erstmals eine selektive Proteinbindung, die lediglich bei der Sepharose-Darponmatrix **83a** zu detektieren war und weder bei den anderen Darponmatrices noch bei der Naphtholkontrolle erschien. Im anschließenden Hemmtest mit der aktiven Darponverbindung **2B** konnte das Signal bei 39 kDa jedoch nur schwach vermindert werden, während eine Inkubation mit ATP keinen Einfluss auf die Bandenintensität ausübte. Die Proteinbande wurde aus dem Coomassie-Gel isoliert und als Signal der beiden Proteine GAPDH und Pepsinogen C identifiziert.

Abb. 4-19: Elektropherogramm der aus HG-Extrakt (HG = human gamete cells) isolierten Proteine (Silberfärbung)

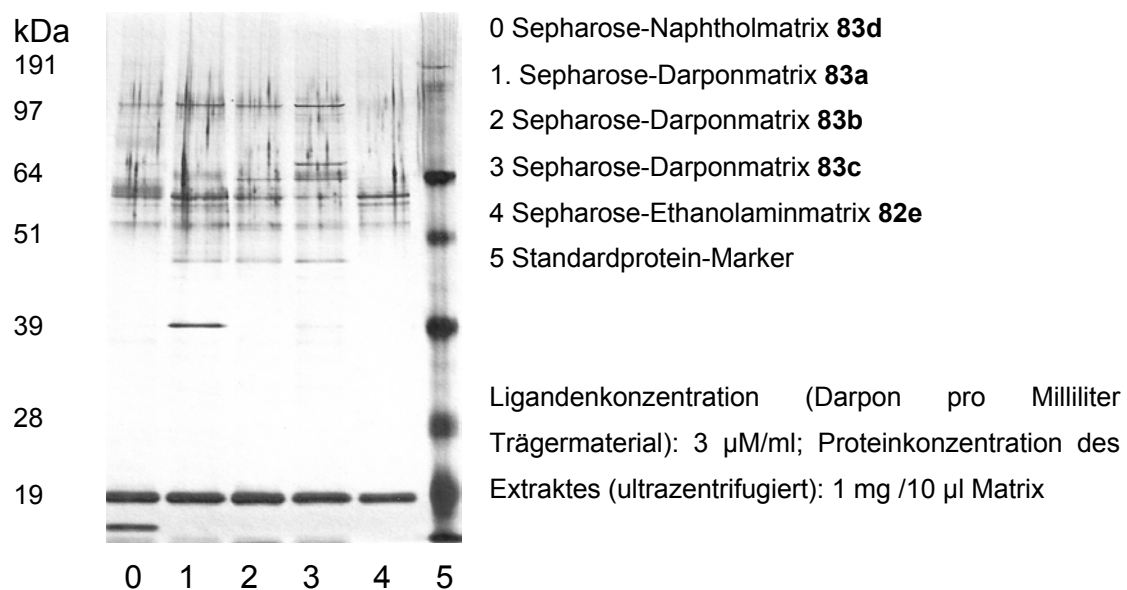
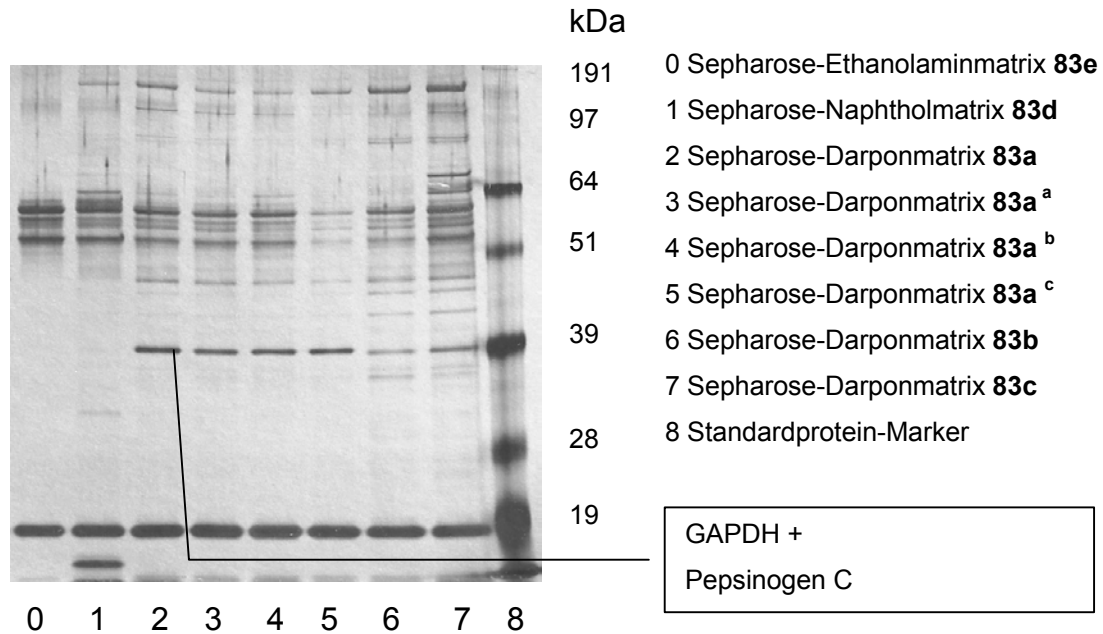


Abb. 4-20: Elektropherogramm der aus HG-Extrakt (HG = human gamete cells) isolierten Proteine (Silberfärbung)



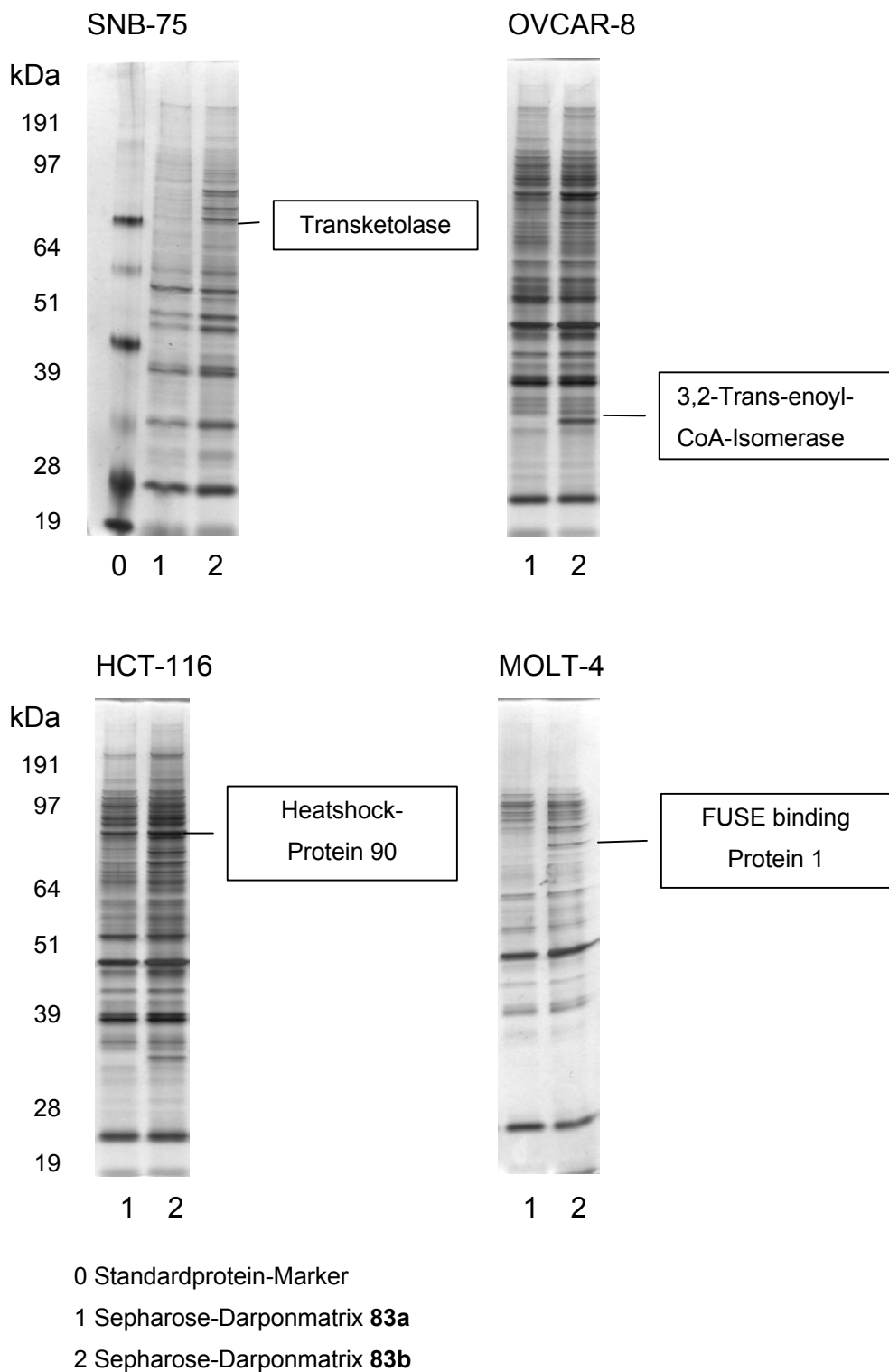
Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial): 3 μ M/ml; Proteinkonzentration des Extraktes (ultrazentrifugiert): 1 mg /10 μ l Matrix. Der verwendete Extrakt wurde mit 10 μ l einer 10 mM Lösung in DMSO des ^a aktiven Darpons **2B**, ^b inaktiven Darpons **Kun68** vorbehandelt. ^c Inkubation in Gegenwart von ATP (10 mM).

4.4.3.5 Inkubation mit Tumorzellextrakten

Wie eingangs am Beispiel des EGF-Rezeptors beschrieben wurde, weisen entartete Zellen häufig eine Überexpression bestimmter Proteine auf, welche für die erhöhte Proliferation verantwortlich sind.^{21, 22} Eine gezielte Hemmung dieser Proteine kann den Tumor am Wachstum hindern und stellt somit einen Ansatz in der Tumorthherapie dar. Unter der Annahme, dass Darpon-sensitive Krebszelllinien vermehrt solche Strukturen ausbilden, die durch die Substanzklasse inhibiert werden, sollten Affinitätsuntersuchungen mit Tumorzelllinien durchgeführt werden. Die immobilisierten Darpone könnten demzufolge die affinen Proteine in großen Mengen adsorbieren, die im Anschluss als eindeutige Bande im Elektropherogramm zu detektieren wären.

Um diese These zu verifizieren wurden drei Krebszelllinien untersucht, die im ADS des NCI besonders stark von den Darponen gehemmt wurden. Als Referenz sollten auch solche Zelllinien zum Einsatz kommen, die sich als unempfindlich gegenüber den entsprechenden Verbindungen erwiesen hatten. Es wurden SNB-7, OVCAR-8 und HCT-116 als sensitive, bzw. MOLT-4 und SK-MEL-5 als relativ unempfindliche Zellreihen verwendet. Aufgrund der geringen Menge an biologischem Material war es nicht möglich, zusätzliche Studien mit Vorinkubation durchzuführen. Außerdem wurde aufgrund des übereinstimmenden Bandenmusters der Darponmatrices **83a** und **83c** bei den vorangegangenen Studien mit Schweinehirnextrakt und Hefezellhomogenaten nur die zuerst genannte Matrix verwendet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4-21 zusammengefasst. Die Isolierung der visualisierbaren Proteinbanden erfolgte aus dem Coomassie-Gel.

Abb. 4-21: Silberfärbung nach Inkubation mit Krebszelllinien



Ligandenkonzentration (Darpon pro Milliliter Trägermaterial): 3 μ M/ml; Proteinkonzentration des Extraktes (ultrazentrifugiert): 1 mg /10 μ l Matrix

5 Biologische Aktivität von Darponen

5.1 Biologische Aktivität und Struktur-Wirkungsbeziehung von funktionalisierten Darponen

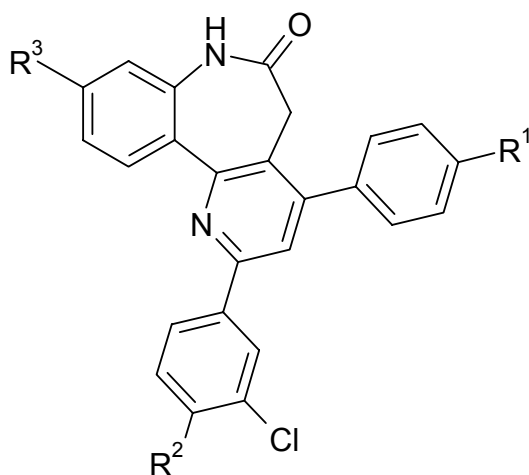
Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten funktionalisierten Darpone wurden am National Cancer Institut (NCI) in New York hinsichtlich ihrer antiproliferativen Wirkung getestet. Das dafür verwendete Verfahren des In Vitro Cell Linie Screening Projects (IVCLSP) wurde bereits in den Kapiteln 1 und 2 ausführlich beschrieben. Als Voraussetzung für die Testung einer Substanz muss die Verbindung zunächst in einem Prescreening drei ausgewählte Zelllinien (NCI-H460, MCF7 und SF-268) signifikant am Wachstum hindern. Alle in diesem Kapitel aufgeführten Verbindungen haben diesen Test durchlaufen und wurden im Anschluss an den 60 verschiedenen Tumorzelllinien getestet.

Für die Betrachtung der biologischen Aktivität werden die mittlere in vitro Antitumoraktivität in Form der \log_{10} GI₅₀ MG-MID-Werte, und die Zellreihen-Selektivitätsprofile im Vergleich zur Darponleitstruktur **2B** diskutiert. Im gleichen Zuge sollen mittels der Matrix-COMPARE-Analyse an entscheidenden Stellen Struktur-Wirkungsbeziehungen der unterschiedlichen Substituenten analysiert werden. Die dafür herangezogenen Korrelationen wurden nach dem in Kapitel 2 vorgestellten Verfahren mit Hilfe des COMPARE-Algorithmus ermittelt.^{15, 16, 24}

Die Ergebnisse der IVCLSP Testungen der drei unterschiedlich substituierten Methoxydarpone **35a-c** sind in der Tabelle 5.1 zusammengefasst. Anhand der \log_{10} GI₅₀ MG-MID-Werte ist ersichtlich, dass die Einführung einer Methoxyfunktion für Position R¹ oder R² der Leitstruktur unter Erhalt der mittleren in vitro Antitumoraktivität möglich ist. Lediglich bei Verbindung **35c** führt der Methoxysubstituent zu einer Abnahme des \log_{10} GI₅₀ MG-MID-Wertes um fast eine Zehnerpotenz auf -4,65. Darüber hinaus besteht eine ausgeprägte Sensitivität der Zelllinien HCT-116 und U251 gegenüber den Verbindungen **35a**

und **35b** mit $\log_{10} \text{GI}_{50}$ -Werten von -5,9 bis -6,4. Das Darpon-typische Selektivitätsprofil wird durch den Methoxysubstituent sichtbar beeinflusst. Während die Verbindung **35a** noch eine relativ hohe Korrelation mit der Leitstruktur **2B** aufweist, sind die jeweiligen Korrelationen zwischen den Darponen **35b** sowie **35c** deutlich schwächer (0,291 bzw. 0,344).

Tab. 5.1: Mittlere in vitro Aktivität ($\log_{10} \text{GI}_{50}$ MG-MID-Werte) und Korrelation zur Leitstruktur **2B** der Methoxydarpone **35a-c**



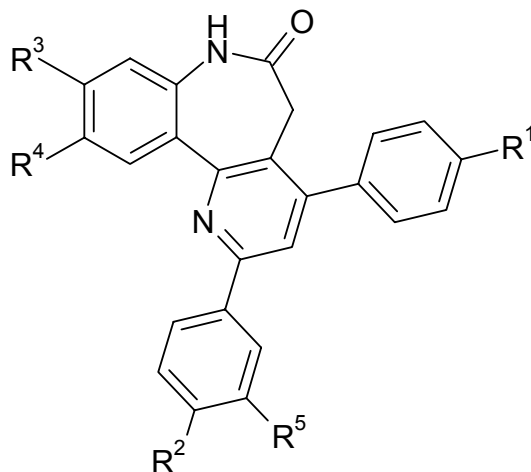
	R ¹	R ²	R ³	$\log_{10} \text{GI}_{50}$ MG-MID	Korrelation mit 2B ^a
35a	OMe	H	H	-5,62	0,541 (50)
35b	H	OMe	H	-5,49	0,291 (50)
35c	H	H	OMe	-4,65	0,344 (58)
2B	H	H	H	-5,49	-

^a angegeben als Pearson Correlation Coefficient, in Klammern ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Zellreihen angegeben.

Die Reihe der getesteten Hydroxydarpone **32a-c** ist in der Tabelle 5.2 aufgeführt. Die mittlere Antitumoraktivität nach Einführung der Hydroxyfunktion ist insgesamt nur leicht gegenüber der Leitstruktur **2B** gesunken. Das Hydroxydarpon **32a** weicht mit einem \log_{10} GI₅₀ MG-MID-Wert von -4,99 als niedrigster Wert lediglich um eine halbe Zehnerpotenz von der GI₅₀-Konzentration der Leitstruktur ab. In der Verbindung **71** ist die OH-Gruppe über einen Propargylrest an Position R³ mit dem Darpongrundgerüst verbunden. **71** weist mit einem \log_{10} GI₅₀ MG-MID-Wert von -5,48 eine etwa gleiche mittlere antiproliferative Wirkung wie die Leitstruktur **2B** auf. Sehr auffällig sind dagegen die stark differierenden Selektivitätsprofile der OH-Gruppen-haltigen Darponverbindungstypen, die sich in den niedrigen bis negativen Korrelationskoeffizienten bezogen auf **2B** äußern.

Die Matrix-COMPARE-Analyse (vergl. Kapitel 2.2) der Hydroxydarpone **32a-c** und **71** in Tabelle 5.3 zeigt jedoch, dass sich innerhalb dieser Substanzgruppe hohe Korrelationen wieder finden. Diese bestehen auch zu weiteren phenolischen Verbindungen aus der Darponbibliothek, die keinen Chlorsubstituenten in 3-Position des 2-Phenylrings tragen (**2U** und **2V**). Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,688 ist die Ähnlichkeit der Selektivitätsprofile am stärksten zwischen den Verbindungen **32c** und **71** ausgeprägt, bei denen die OH-Gruppe über den Propargylrest, bzw. direkt an Position 10 des Darponkörpers gebunden ist. Analog zu den Untersuchungen über Cyclopenta[e]azepine-dione **33** von Kunick et al.,²⁶ lässt sich anhand dieser Beobachtungen die These postulieren, dass OH-Gruppen-haltige Darpone ihre antiproliferative Wirkung über einen gemeinsamen Mechanismus entfalten,²⁵ der sich von dem der typischen Vertreter aus der Darponklasse unterscheidet.

Tab. 5.2: Mittlere in vitro Aktivität (\log_{10} GI₅₀ MG-MID-Werte) und Korrelation zur Leitstruktur **2B** der Darpone **32a-c** und **71**



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	\log_{10} GI ₅₀ MG-MID	Korrelation mit 2B ^a
32a	OH	H	H	H	Cl	-4,99	0,084 (50)
32b	H	OH	H	H	Cl	-5,27	-0,260 (58)
32c	H	H	OH	H	Cl	-5,39	-0,047 (58)
71	H	H	H	-C ₂ CH ₂ OH	Cl	-5,48	-0,166 (58)
2B	H	H	H	H	Cl	-5,49	-
2U	OH	OH	H	H	H	-5,289	-0,363 (60)
2V	OH	H	H	H	H	-5,284	-0,170 (59)

^a angegeben als Pearson Correlation Coefficient, in Klammern ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Zellreihen angegeben.

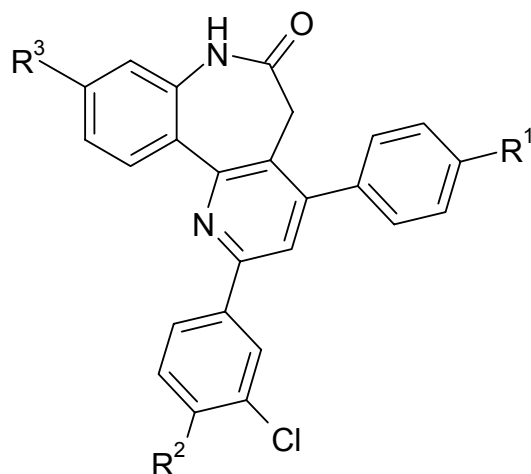
Tab. 5.3: Korrelationsmatrix^a von Hydroxydarponen und der Leitstruktur **2B**

2U	2V	32a	32b	32c	71	Verbindung
-0,363 (60)	-0,170 (59)	0,084 (50)	-0,260 (58)	-0,047 (58)	-0,166 (58)	2B
	0,491 (59)	0,338 (50)	0,455 (58)	0,473 (58)	0,397 (58)	2U
		0,489 (50)	0,417 (57)	0,577 (57)	0,382 (57)	2V
			0,519 (49)	0,578 (49)	0,431 (49)	32a
				0,579 (58)	0,499 (58)	32b
					0,688 (58)	32c

^a Angegeben ist der Pearson Correlation Coefficient (PCC) des Vergleichs zweier Verbindungen, die durch Berechnung mit dem COMPARE-Algorithmus erhalten wurden. In Klammern ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Zellreihen angegeben. Werte mit PCC>0,4 sind fett gedruckt.

Die Gruppe der wasserlöslichen Darpone wird von den Regioisomeren **a-c** der Verbindungsgruppen **50**, **51** und **52** gebildet. Für alle Substanzen gelang die Einführung der solubilisierenden Seitenkette unter Erhaltung der antiproliferativen Wirkung, die bei drei Verbindungen (**50c**, **52a** und **52c**) die mittlere Aktivität der Leitstruktur sogar übertrifft (siehe Tabelle 5.4). Dabei fällt innerhalb einer Verbindungsgruppe die mittlere Aktivität der **b**-Regioisomere stets geringer aus als die der **a** und **c**-Regioisomere. Die stärkste Abnahme der log₁₀ GI₅₀ MG-MID Werte gegenüber der Leitstruktur ist für die Verbindung **50b** auf -4,85, die stärkste Zunahme für **52a** auf -5,88 zu verzeichnen. Betrachtet man die Verbindungsreihen **a** und **b**, so ist eine Steigerung der mittleren Aktivität von der primären Aminogruppe, über den Morpholin- zum N-Methylpiperazinrest zu erkennen. Die durch den COMPARE-Algorithmus ermittelten Korrelationen mit der Leitstruktur **2B** fallen für alle wasserlöslichen Darpone sehr niedrig aus. Wie bei der Gruppe der Hydroxydarpone **32** hat die Einführung der Substituenten bei diesen Substanzgruppen den Verlust des Darpon-typischen Selektivitätsprofils zur Folge.

Tab. 5.4: Mittlere in vitro Aktivität (\log_{10} GI₅₀ MG-MID-Werte) und Korrelation zur Leitstruktur **2B** der Verbindungsgruppen **50**, **51** und **52**



	R ¹	R ²	R ³	\log_{10} GI ₅₀ MG-MID	Korrelation mit 2B ^a
50a	X-NH ₃ Cl	H	H	-5,20	-0,168 (58)
50b	H	X-NH ₃ Cl	H	-4,85	-0,206 (57)
50c	H	H	X-NH ₃ Cl	-5,65	-0,070 (59)
51a		H	H	-5,29	-0,391 (58)
51b	H		H	-5,15	-0,301(58)
51c	H	H		-5,29	-0,157 (59)
52a		H	H	-5,88	0,013 (58)
52b	H		H	-5,40	-0,144 (59)
52c	H	H		-5,76	-0,073 (59)
2B	H	H	H	-5,49	-

X= O-(CH₂)₄, ^a Angegeben ist der Pearson Correlation Coefficient (PCC) des Vergleichs zweier Verbindungen, die durch Berechnung mit dem COMPARE-Algorithmus erhalten wurden. In Klammern ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Zellreihen angegeben.

Um Aussagen über einen von den typischen Darponen abweichenden gemeinsamen Mechanismus der wasserlöslichen Verbindungen **50**, **51** und **52** treffen zu können, wurde auch für diese Gruppe eine Matrix-COMARE-Analyse durchgeführt, die in Tabelle 5.5 dargestellt ist. Die Auswertung der Korrelationen erfolgte bezüglich der Seitenkettenanbindungsstellen am Darpongrundgerüst und der drei unterschiedlichen stickstoffhaltigen Reste.

Tab. 5.5: Korrelationsmatrix^a der wasserlöslichen Darpone

50a	51a	52a	50b	51b	52b	50c	51c	52c	Verbindung
-0,168 (58)	-0,391 (58)	0,013 (58)	-0,206 (57)	-0,301 (58)	-0,144 (59)	-0,070 (59)	-0,157 (59)	-0,073 (59)	2B
	0,289 (58)	0,433 (58)	0,258 (56)	0,104 (57)	0,324 (58)	0,026 (58)	0,008 (58)	0,326 (58)	50a
		0,103 (58)	0,474 (56)	0,697 (57)	0,603 (58)	0,014 (58)	0,306 (58)	0,217 (58)	51a
			0,101 (56)	-0,115 (57)	0,088 (58)	0,090 (58)	-0,209 (58)	0,272 (58)	52a
				0,527 (57)	0,750 (57)	0,493 (57)	0,468 (57)	0,524 (57)	50b
					0,577 (58)	0,333 (58)	0,607 (58)	0,251 (58)	51b
						0,270 (59)	0,410 (59)	0,578 (59)	52b
							0,188 (59)	0,295 (59)	50c
								0,385 (59)	51c

^a Angegeben ist der Pearson Correlation Coefficient (PCC) des Vergleichs zweier Verbindungen, die durch Berechnung mit dem COMPARE-Algorithmus erhalten wurden. Die Verbindungen sind nach Anknüpfungsstelle der Seitenkette an die Darponstruktur geordnet. In Klammern ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Zellreihen angegeben. Werte mit PCC>0,4 sind fett gedruckt.

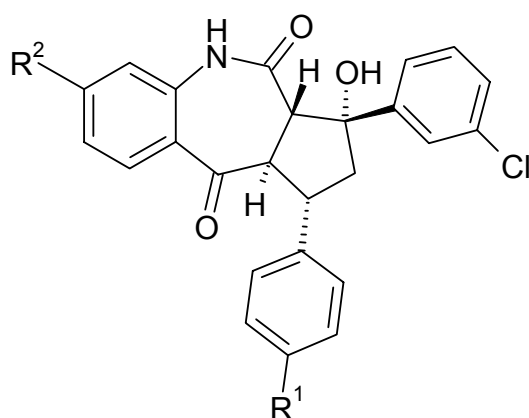
Innerhalb der Verbindungsgruppen **50**, **51** und **52** sind bis auf eine Ausnahme nur zwischen den Anbindungsstellen der jeweiligen **b**- und **c**-Reihe hohe Korrelationen mit Werten von ca. 0,5-0,6 zu beobachten. Demzufolge wird in jeder Gruppe die Seitenkette in Positionen R^2 oder R^3 unter Erhalt eines ähnlichen Selektivitätsmusters toleriert,²⁵ welches sich gleichermaßen von der in Anbindungsstelle R^1 (nur für Verbindungsgruppe **50** und **52**) abgrenzt. Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Widerspruch zu den Beobachtungen aus den Affinitätsuntersuchungen mit den immobilisierten Aminodarponverbindungen (vergl. Kapitel 4.4.3.2). Bei diesen wurde für die immobilisierten Regioisomere der **a**- und **c**-Reihe stets das gleiche Proteinbandenmuster detektiert, wogegen das Muster der **b**-Reihe davon deutlich zu unterscheiden war. Eine genaue Klärung dieses Sachverhaltes kann jedoch erst erfolgen, wenn ein molekulares Target der Darponklasse eindeutig identifiziert ist.

Im Vergleich der Verbindungen mit den drei unterschiedlichen stickstoffhaltigen Resten gleicher Seitenkettenanbindungsstelle zeigen sich für die **b**-Reihe stets hohe Korrelationskoeffizienten mit Werten über 0,5. Dieses beutet, dass die solubilisierende Seitenkette an dem 2-Phenylrest der Darponstruktur keinen entscheidenden Einfluss auf das Selektivitätsprofil innerhalb dieser Verbindungsreihe besitzt. Für die **a**- und **c**-Reihe konnte dagegen nur jeweils ein Korrelationswert über 0,4 beobachtet werden. Für diese beiden Anbindungsstellen scheint der Substituent einen stärkeren Effekt auf die Selektivität gegenüber bestimmten Tumorzelllinien auszuüben.

Die Ergebnisse der Matrix-COMPARE-Analyse der wasserlöslichen Darpone **50**, **51** und **52** zeigen zum einen, dass die antiproliferative Aktivität der Substanzen auf einem anderen Mechanismus als die der Leitstruktur basieren muss. Zum anderen deuten die Befunde darauf hin, dass aufgrund der sehr uneinheitlichen Korrelationen auch innerhalb dieser Gruppe unterschiedliche molekulare Zielstrukturen einzelner Verbindungen vorliegen können.

Die aus der Synthesesequenz der Darpone als Cyclopentan-anellierte Nebenprodukte erhaltenen Verbindungen **33a** und **33c** wurden ebenfalls im IVCLSP des NCI getestet. Für **33a** deckt sich die moderate antiproliferative Aktivität und Selektivität für die Zellreihe NCI-H460 mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften dieser Substanzklasse.⁵ Befindet sich der Methoxysubstituent in Position R² an dem Benzoanellanden, so steigt die mittlere Aktivität an, wogegen die Selektivität für NCI-H460 verloren geht.

Tab. 5.6: Mittlere in vitro Aktivität (log₁₀ GI₅₀ MG-MID-Werte) von **33a,c**



	R ¹	R ²	log ₁₀ GI ₅₀ MG-MID
33a	OMe	H	-4,18
33c	H	OMe	-4,76

5.2 Ergebnisse der Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen

Die Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen ergaben im Allgemeinen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteinbindungen, die unabhängig vom verwendeten Zellhomogenat und von der Anbindungsstelle des Linkers am Darponmolekül auftraten. Durch die Versuchsreihen mit den Naphtholmatrices konnte belegt werden, dass diese Proteinbindungen größtenteils auf unspezifischen lipophilen Wechselwirkungen beruhen. Viele Proteine besitzen lipophile Areale, die für Funktionen, wie transmembranäre Domänen oder Substratbindungstaschen von entscheidender Bedeutung sind.⁷⁶ Die dafür verantwortlichen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin tragen aliphatische oder aromatische Reste, welche mit den Strukturen der immobilisierten Darpon- und Naphtholverbindungen offensichtlich gleichermaßen in Wechselwirkung treten können. Eine eindeutige Identifizierung spezifischer Proteinbanden wurde durch diese Problematik erheblich erschwert. Die unter 4.4.3.2 erprobten Methoden ergaben dennoch Hinweise auf Signale, die für eine Isolierung und Zuführung zur Proteinanalytik infrage kamen. Hierzu zählten:

- Signalminderung durch Zugabe einer Lösung des aktiven Darpons **2B**
- Bandenmuster unterscheidet sich von dem anderer Ligandenanbindungsstellen
- Bandenmuster unterscheidet sich deutlich von dem der Naphtholmatrix.

Unter Anwendung dieser Kriterien wurden aus den verschiedenen Zellhomogenaten insgesamt 22 der im Coomassie-Gel sichtbaren Proteinbanden isoliert. Die Auswertung der Human- und Hefeproteine erfolgte durch Abgleich der detektierten Molekulargewichte im MALDI-TOF-MS mit den Informationen aus den Proteindatenbanken der jeweiligen Spezies. Zur Auswertung der aus Schweinehirn gewonnenen Proteine wurden die ermittelten

Daten mit den Informationen aus Datenbanken von Mensch, Maus, Ratte und Rind verglichen. Für einige Banden wurde ein Gemisch aus mehreren Proteinen ähnlicher Molekularmasse identifiziert. Eine Aussage über genaue pharmakologische Eigenschaften der Darpone an den identifizierten Proteinen kann jedoch erst durch Untersuchungen am jeweiligen isolierten Enzym getroffen werden.

Die Diskussion der identifizierten Proteine erfolgt im Hinblick auf die Tatsache, dass das Darpon **2A** (= NSC 682565) bevorzugt das Wachstum der Zelllinien unterdrückt, die den EGFR-aktivierenden Liganden TGF- α überdurchschnittlich exprimieren. Da eine direkte Wirkung auf den EGF-Rezeptor nicht nachgewiesen werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass ein in der EGFR-Signalkaskade befindlicher Schritt durch die Darpone beeinflusst wird. Gelänge es, die Funktion der identifizierten Proteine hiermit in Verbindung zu bringen, so könnte dies Aufschluss über die widersprüchliche Datenlage bringen. Die Recherche konzentrierte sich daher auf antiproliferative Effekte, die für die isolierten Enzyme in der Literatur beschrieben sind und im Zusammenhang mit EGFR-vermittelten Wirkungen stehen.

5.2.1 Chaperone

Molekulare Chaperone gehören einer Gruppe von strukturell unterschiedlichen Proteinen an, die auf verschiedene Weise Einfluss auf die dreidimensionale Struktur anderer Proteine nehmen. Einerseits schützen sie neu synthetisierte Aminosäureketten vor schädlicher Aggregation, andererseits sind sie in der Lage, die Tertiärkonformation von Proteinen zu konservieren und zu bewahren.⁷⁷

5.2.1.1 Heat-Shock-Protein 90 β

Das Heat-Shock-Protein 90 β (HSP90) wurde aus dem Homogenat der Tumorzelllinie HCT-116 isoliert. Es wurde von dem immobilisierten Darpon **83b** deutlich stärker gebunden als durch das isomere Darpon **83a**, was für eine spezifische Bindung des Proteins spricht. Dieses Bandensignal war ebenfalls bei den Untersuchungen mit den Zelllinien SNB-75, OVCAR-8 und MOLT-4 zu detektieren.

HSP90 wird als potentiell Target der Tumorthherapie intensiv erforscht; es gehört zur Familie der Hitzeschockproteine.⁷⁸ Diese weisen bei unphysiologisch hohen Temperaturen eine gesteigerte Syntheserate auf und sorgen für die Funktionserhaltung bestimmter Proteine, indem die korrekte funktionelle Konformation konserviert oder wieder hergestellt wird. Auch andere Faktoren wie oxidativer Stress oder zellschädigende Substanzen können zu einer Anhäufung von Proteinaggregaten führen und dadurch das Auftreten von Hitzeschockproteinen auslösen.⁷⁹ Das HSP90 ist ein konstitutives Homodimer, welches über die beiden C-terminalen Enden der Monomere verbunden ist und in seiner Struktur einer einseitig offenen Rohrschelle gleicht. Auf der Innenseite sind aliphatische Aminosäurereste lokalisiert, die mit den hydrophoben Bereichen eines angelagerten ungefalteten Proteins in Wechselwirkung treten und es so an der unerwünschten Aggregation hindern. Unter Verbrauch von ATP wird die Schelle um das Protein mit Hilfe des Co-Chaperons p23 geschlossen. Wenn alle hydrophoben Bereiche innerhalb des Proteins

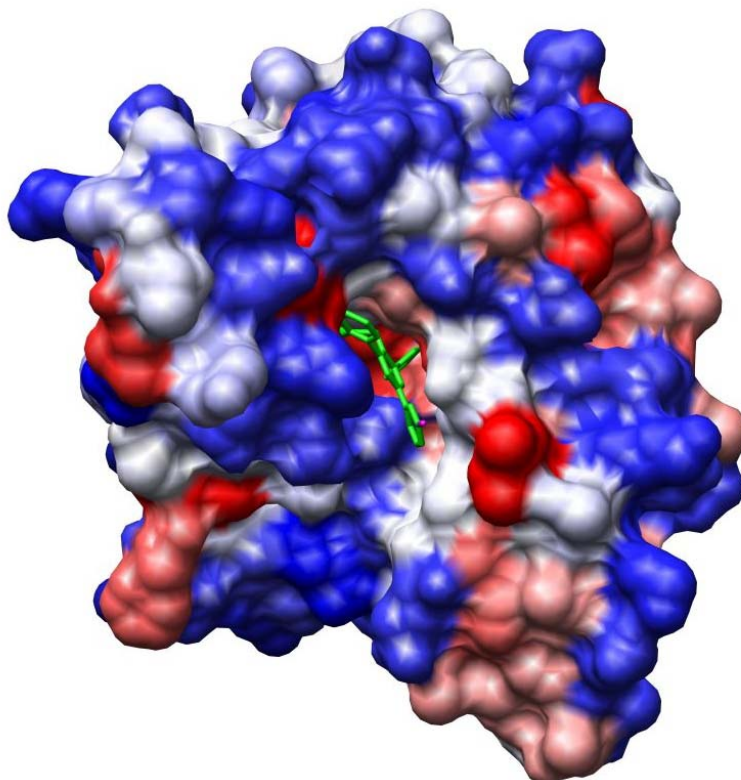
abgesättigt sind und es seine native Konformation erreicht hat, öffnet sich die Schelle unter Verbrauch eines weiteren Moleküls ATP und entlässt das Substrat.⁸⁰ Zu den Proteinen, die mit HSP90 interagieren, zählen Kinasen, Hormonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren, wobei viele dieser „Client“-Proteine gleichzeitig Produkte verschiedener Onkogene (z.B. Her2, Raf-1, CDK4, p53 etc.) darstellen. Es wird postuliert, dass Krebszellen ohne ausreichende HSP90-Aktivität der Zelltod aufgrund der zahlreichen unbehobenen Proteinmutationen ereilt. Obwohl das HSP90 auch zur Homöostase nicht mutierter gesunder Zellen beiträgt, scheinen Tumorzellen wesentlich empfindlicher auf eine Hemmung des Enzyms zu reagieren. Untersuchungen mit HSP90-Inhibitoren zeigten eine Antitumor-Aktivität ohne nennenswerte Toxizität. Dieses könnte an der für die GHKL-Familie (GHKL = DNA Gyrase subunit, HSP90, Histidin Kinase, MutL) charakteristischen ATP-Bindungstasche liegen. Diese ist in der N-terminalen Domäne des Proteins, dem „Bergerat-fold“ lokalisiert und unterscheidet sich fundamental von ATP-bindenden Arealen anderer Chaperone oder Proteinkinasen. Geldanamycin, ein HSP90-Inhibitor der Ansamycin-Klasse, bindet an diese Stelle und hemmt die HSP90-ATPase in nanomolaren Konzentrationen. Ein Derivat des Geldanamycin (17AAG) befindet sich zurzeit in klinischer Phase I/II für die Mono- und Kombitherapie maligner Tumorerkrankungen. Neben der Ansamycin- Radicicolgruppe wurde eine überschaubare Zahl weiterer HSP90-Inhibitoren publiziert, die sich in Diarylpyrazole, Purine, und Purin-ähnliche azoanellierte Pyrimidine unterteilen lassen.⁸¹

Supino-Rosin et al. berichten, dass Geldanamycin im Cytosol den Abbau des EGF-Rezeptors beschleunigt und gleichzeitig dessen intrazelluläre Reifung verlangsamt.⁸² Auch bei dem Struktur-homologen Rezeptor p185^{c-erbB-2} konnte anhand Brustzellkarzinomzellen (SKBr3) ein rapider Abbau in Gegenwart des HSP90-Inhibitors durch Proteasomen nachgewiesen werden.⁸³ Diese Erkenntnisse bieten einen Ansatz, die Wirkung der Darpone auf die EGF-Rezeptor-Signalkaskade durch die HSP90-inhibitorische Eigenschaft zu erklären.

Um diese Arbeitshypothese zu verifizieren wurden zunächst Docking-Experimente mit dem Darpon **2B** am HSP90-Modell durchgeführt (Verwendete Programme: HyperChem, ArgusLab). Als Basis diente die von Dymock et al. publizierte Röntgenkristallstruktur des Co-Kristallisats von HSP90 mit dem Inhibitor VER49009 (Die röntgenkristallographischen Daten wurden von der Proteindatenbank der Rutgers University bezogen⁸⁴).⁷⁹ Die Untersuchungen zeigten, dass sich das Darpon gut in die ATP-Bindungstasche einfügen lässt. Der hydrophobe Bereich innerhalb der Bindungstasche wird durch den 4-Arylrest und dem Benzazepinkörper des Darpons ausgefüllt, während der 2-Phenylrest nach außen zeigt. Dieses entspricht der Position des Darpons, für die ein intensives Signal in den Affinitätsuntersuchungen bei Anknüpfung des Linkers am 2-Phenylring resultierte (siehe Abbildung 5.1). Wie in Abbildung 5.2 dargestellt ist, deckt sich die räumliche Ausdehnung des Darpons in der ATP-Bindungstasche ungefähr mit der des Inhibitors VER49009.

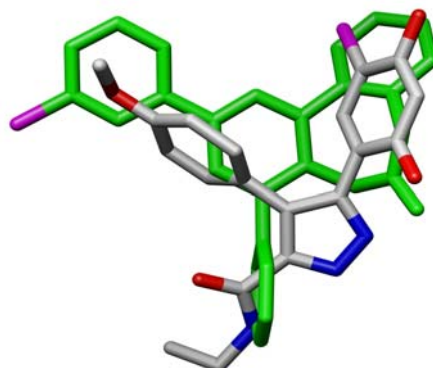
Zusätzlich zu den Dockingexperimenten wurden COMPARE-Analysen (vergl. Kapitel 2.4) für die Aminobutoxydarphone **50a-c** durchgeführt. In diesen wurden die einzelnen Selektivitätsprofile der Substanzen mit denen von Standardverbindungen aus der NCI-Datenbank verglichen, deren antiproliferativer Wirkmechanismus bereits bekannt ist. Hohe Korrelationskoeffizienten, die sich zwischen Standardsubstanz und Testverbindung ergeben, deuten auf einen möglichen gemeinsamen Wirkmechanismus der Strukturen hin.²⁵ Für Verbindung **50a** wurde das Geldanamycinderivat Macbecin II mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,499 an siebter Stelle von 154 Standardverbindungen gelistet. Weitere Treffer des Macbecin II fanden sich auch für den Vertreter der Morpholinobutoxydarphone **51a** (Platz 14, PCC = 0,461) und *N*-Methylpiperidinbutoxydarphone **52c** (Platz 22, PCC = 0,384).

Abb. 5.1: HSP90 mit Darpon **2B** in der ATP-Bindungstasche



Darpon (grün) in der ATP-Bindungstasche des HSP90. Die hydrophilen Areale sind blau, die hydrophoben rot dargestellt. Der hydrophobe Bereich innerhalb der Bindungstasche wird durch den 4-Arylrest und dem Benzazepinkörper des Darpons ausgefüllt, während der 2-Phenylrest nach außen zeigt. Dieses entspricht der Position des Darpons, für die ein intensives Signal in den Affinitätsuntersuchungen bei Anknüpfung des Linkers am 2-Phenylring resultierte. Quelle der röntgenkristallographischen Daten: Proteindatenbank der Rutgers University.⁸⁴

Abb. 5.2: Überlagerte Strukturen von Darpon **2B** und VER49009



Räumliche Ausrichtung in der ATP-Bindungstasche des HSP90 vom Darpon **2B** (grün), überlagert mit der des HSP90-Inhibitors VER49009 (grau)

Die bisherigen Befunde ergaben einen begründeten Verdacht dafür, dass die Substanzklasse der Darpone eine weitere Gruppe von HSP90-Inhibitoren darstellt. Daher wurden eine Auswahl von Darponverbindungen, darunter die Leitstruktur **2B** und Vertreter der Aminobutoxydarpone an der Brustkrebszelllinie SKBr3 getestet, auf die HSP90-Inhibitoren üblicherweise einen cytotoxischen Effekt besitzen (Arbeitsgruppe G. Chiosis et al., Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York).⁸⁵ Es konnte jedoch für keine der 14 Testverbindungen eine signifikante Abtötung der initialen Zellpopulation unterhalb einer Konzentration von 50-100 μM beobachtet werden.⁸⁶ Die Affinität des HSP90 gegenüber dem immobilisierten Darpon wird folglich nicht über eine Einlagerung in die ATP-Bindungs tasche, sondern vermutlich über unspezifische Wechselwirkungen mit den lipophilen Aminosäureresten des Proteins vermittelt.

5.2.1.2 Importin β

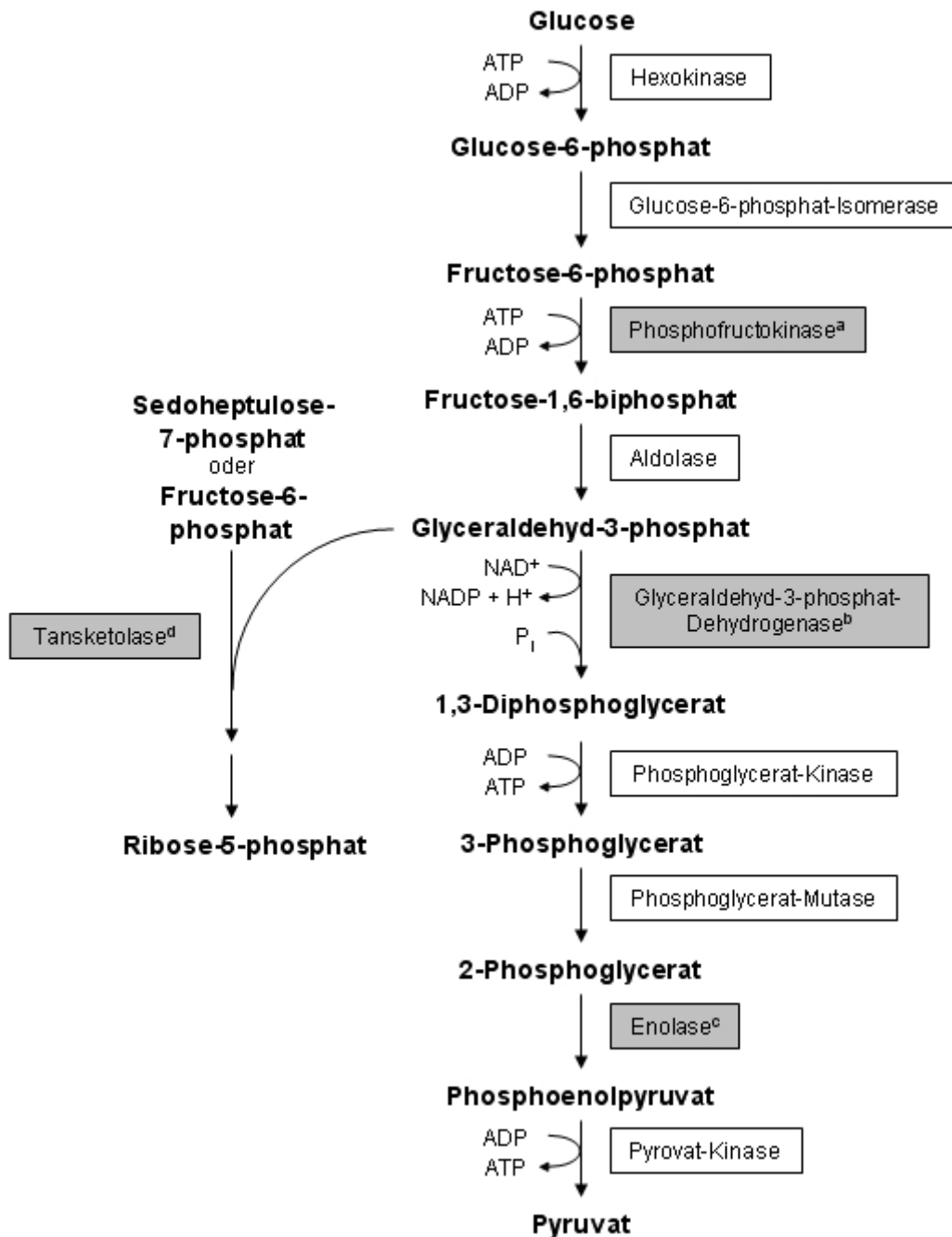
Das aus Schweinehirn isolierte Importin $\beta 1$ (Kariopherin $\beta 1$) ist ein nukleärer Transportrezeptor, der zusammen mit Importin α den Transport von Proteinen in den Zellkern gewährleistet.⁸⁷ Dabei erfüllen die Kariopherine in einem gewissen Maße Aufgaben, die der Funktion von Chaperonen gleichen.⁸⁸ Histone und andere basische Proteine, die im Zellkern benötigt werden, liegen im physiologischen Milieu positiv geladen vor. Nach der Proteinbiosynthese werden diese polykationischen Strukturen von dem Kariopherin Transportkomplex eingeschlossen, wodurch die geladenen Zentren geschützt und somit Aggregationen verhindert werden.⁸⁸ Im Anschluss wird die Fracht mittels des Komplexes in den Zellkern transportiert, wo er durch Anlagerung einer GTPase an die N-terminale Domäne des Importins $\beta 1$ wieder dissoziieren kann.⁸⁸ Alle Importin β Isoformen weisen typische Phenylalanin/Glycin Wiederholungen in der Aminosäuresequenz auf, welche für die Substratbindung von entscheidender Rolle sind.^{88, 89} Phenylalanin ist aufgrund seiner aromatischen Struktur in der Lage lipophile Wechselwirkungen mit den Phenylringen der Darpone einzugehen, was eine unspezifische Bindung des Importin $\beta 1$, wie auch beim HSP90, nahe liegend erscheinen lässt.

5.2.2 Isolierte Enzyme des Energie-Stoffwechsels

Aus Zellhomogenaten verschiedener Spezies wurden Enzyme identifiziert, die eine wichtige Rolle in dem Energie-Stoffwechsel der Zelle einnehmen. So konnten neben Enzymen aus Atmungskette, Fettsäuremetabolismus und Pentosephosphat-Weg Schlüsselenzyme der Glycolyse durch die Affinitätsuntersuchungen mit den immobilisierten Darponen nachgewiesen werden. Die Glycolyse gewährleistet die Energieversorgung der Zelle und umfasst den Abbau der Glucose zum Pyruvat. Es konnten drei Enzyme aus diesem Stoffwechselweg identifiziert werden, welche in der schematischen Darstellung in Abbildung 5.3 als grau hinterlegte Felder aufgeführt sind.

Viele schnell wachsende Tumorzellen decken ihren gesteigerten Energiebedarf durch eine erhöhte Glycolyserate, welche zum einen durch Aktivierung der Glycolyseenzyme und zum anderen durch deren Überexpression erfolgen kann.⁹⁰ Die Mechanismen, die dieser Regulation zugrunde liegen, bieten Ansatzpunkte für antitumor-wirksame Therapien und darüber hinaus eine mögliche Erklärung für die antiproliferative Eigenschaft der Darpone, die hier im Einzelnen erfolgen soll.

Abb 5.3: Schema der Glycolyse und Ausschnitt des Pentosephosphat-Wegs



Schema der Glycolyse und links abzweigend der Seitenarm des Pentosephosphatwegs (verändert nach Karlson^{91, 92}). Die grau unterlegten Enzyme entsprechen Proteinsignalen, die durch Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen isoliert und identifiziert wurden. ^a isoliert aus Schweinehirnextrakt, ^b isoliert aus HG-Homogenat (HG = human gamete cells), ^c isoliert aus Hefezellextrakt ^d isoliert aus dem Homogenat der Tumorzelllinie SNB-75.

5.2.2.1 Phosphofructokinase-1

Die Phosphofructokinase-1 (PFK-1) stellt ein Schlüsselenzym in der ersten Phase der Glycolyse dar, welches Fructose-6-phosphat an der Hydroxylgruppe des C₁-Atoms unter ATP-Verbrauch zu Fructose-1,6-diphosphat phosphoryliert (siehe Abbildung 5.3). Die Übertragung des Phosphatrestes ist praktisch irreversibel und gilt daher als Schrittmacherreaktion zur Einleitung der Ertragsphase der Glycolyse.⁹¹ Innerhalb der Zelle kann die Regulation der Glycolyseenzym-Aktivität über den Phosphorylierungszustand, allosterische Hemmmechanismen, und der reversiblen Bindung der glycolytischen Enzyme an das Cytoskelett erfolgen.^{90, 93, 94} Beitner et al. beschreibt eine Clotrimazol-induzierte Ablösung der PFK-1 vom Cytoskelett bei verschiedenen Tumorzelllinien, die zu einem dosisabhängigen Abfall der ATP-Konzentration in der Zelle und letztlich zur Apoptose führt.^{95, 96} Da der diesem Effekt zugrunde liegende Mechanismus bislang jedoch nicht vollständig geklärt werden konnte, ist eine Aussage bezüglich der Wirkung von Darpone auf die Ablösung der PFK-1 vom Cytoskelett an dieser Stelle nicht möglich.

Einen interessanten Ansatz bietet jedoch die Betrachtung des EGF im Zusammenhang mit der Glycolyseenzym-Aktivität. So konnten Schneider et. al in 3T3-Tumorzellen eine erhöhte Aktivität der PFK-1 durch EGF Stimulation nachweisen.⁹⁷ Reiss et al zeigten ferner, dass fünf Enzyme der Glycolyse, darunter die aus den Affinitätsuntersuchungen isolierte PFK-1, GAPDH und Enolase-1, als Substrate der Tyrosinkinase-Untereinheit des EGF-Rezeptors fungieren.⁹³ Nach EGF-stimulierter Phosphorylierung stieg bei allen genannten Enzymen die Umsatzgeschwindigkeit auf das Dreifache an. Eine Bindung der Darpone an die beteiligten glycolytischen Enzyme mit einer daraus resultierenden Unterbrechung der Energiebereitstellung für die Zelle könnte auf diese Weise den Eingangs erläuterten Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster des EGF-R-stimulierenden Liganden TGF- α und dem Selektivitätsprofil der Darpone erklären.

5.2.2.2 Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

Das Schlüsselenzym zur Einleitung der Ertragsphase der Glycolyse ist die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), welche die Übertragung eines Wasserstoffs vom Glycerinaldehyd-3-phosphat auf NAD^+ und die anschließende Aufnahme von anorganischem Phosphat zum 3-Phosphoglycerol-1-phosphat katalysiert (siehe Abbildung 5.3).⁹¹ Verschiedene antiproliferative Mittel werden in der Literatur im Zusammenhang mit einem veränderten Expressionslevel der GAPDH beschrieben. So können Bisphosphonate in verschiedenen Tumorzellen die Überexpression des Glycolyseenzyms signifikant vermindern.⁹⁸ Darüber hinaus wurde die GAPDH als Zielstruktur von Saframycin identifiziert. Saframycin zählt zu einer antiproliferativen Substanzklasse von Alkaloiden, deren Effekt auf einer Adduktbildung mit der im Zellkern enthaltenen DNA beruht, woraus die Hemmung der GAPDH resultiert.⁹⁹ Die genannten Substanzen weisen jedoch nur sehr geringe funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten mit den Darponen auf. Daher scheint die von Reiss unter 5.2.2.1 beschriebene Phosphorylierung der GAPDH durch die EGF-R-Tyrosinkinase die plausibelste Erklärung für das Selektivitätsprofil der typischen Darpone zu sein.⁹³

5.2.2.3 Enolase-1

Im vorletzten Schritt der Glycolyse erfolgt die Umsetzung des 2-Phosphoglycerats unter Wasserabspaltung zum Phosphoenolpyruvat (siehe Abbildung 5.3).¹⁰⁰ Die hierfür verantwortliche Enolase-1 wird von dem gleichen Genabschnitt codiert, wie das *myc*-Promoter Binding Protein-1, ein Suppressorprotein des Onkogens *c-myc*,¹⁰¹ welches in Tumorzellen zu einer Überexpression der Glycolyseenzyme führen kann.⁹⁰ Ein Zusammenhang zu der antiproliferativen Wirkung der Darpone lässt sich hieraus jedoch nicht erschließen, weshalb sich die von Reiss beschriebene Verbindung zum EGF-Rezeptor auch in diesem Fall als plausibelste Möglichkeit erweist (vergleiche Kapitel 5.2.2.1).⁹³

5.2.2.4 Transketolase

Die Transketolase (TK) ist ein Thiamindiphosphat-abhängiges Enzym und kommt im nichtoxidativen Teil des Pentosephosphat-Wegs vor. Das aus der Glycolyse stammende Glycerinaldehyd-3-phosphat wird von der TK über einen C_2 -Transfer mit anschließenden Isomerisierungs- und Epimerisierungsreaktionen zum Ribose-5-phosphat umgewandelt, welches eine zentrale Rolle im Aufbau von Nukleotiden im tierischen Gewebe einnimmt (siehe Abbildung 5.3, linker Ast).¹⁰² Oxythiamin und Dehydroepiandrosteron sind Inhibitoren der TK, welche in Kombinationsgabe bei Ehrlichs Ascites Tumor Cells (EATC) zu einem Ribosemangel führen. Dieser hält die Zellen aufgrund des resultierenden RNA-Mangels in der G_1 Phase des Zellzyklus gefangen, was eine dramatische Wachstumshemmung zufolge hat. Unter Einfluss bestimmter Wachstumsfaktoren kommt es dagegen zu einer Anhäufung von Metaboliten des Pentosephosphat-Wegs, welche laut Rais et al. mit einer gegenteiligen Wirkung der TK-Inhibition gleichzusetzen sei.¹⁰³

5.2.2.5 ATP Synthase β -Untereinheit

Die ATP Synthase β -Untereinheit wurde sowohl aus Hefezell-extrakt als auch aus Schweinehirnhomogenat isoliert. Sie bildet zusammen mit der α -Untereinheit eines von drei gleichberechtigten katalytischen Zentren des F_1 -Teils der H^+ -ATP Synthase. Das als Komplex V der Atmungskette bezeichnete Enzym besitzt unterhalb des katalytischen Kopfes einen in die Mitochondriummembran eingelassenen F_0 -Teil. Dieser leitet die Protonen aus dem Intermembranraum zum Mitochondriumcytosol, entlang der drei katalytischen Zentren. Diese unterziehen sich dadurch einer Konformationsänderung und zwingen dabei die Substrate ADP und Phosphat in die hydrophoben Bindungstaschen, die in den β -Untereinheiten lokalisiert sind. Die lipophilen Aminosäurereste in diesen Arealen verhindern die Dissoziation der Phosphatgruppe und erleichtern gleichzeitig die Eliminierung von Wasser aus den Substraten.⁷⁶ Neben dem Cytoplasma ist die ATP Synthase auch auf der Oberfläche von Endothelzellen zu finden, wo sie unter anderem an der

extrazellulären pH-Wert- und ATP-Spiegelregulation beteiligt ist.^{104, 105} Untersuchungen von Moser et al. weisen ferner darauf hin, dass die endotheliale ATP Synthase eine regulative Funktion in der Proliferation und Migration von Endothelzellen besitzt. Angiostatin, ein Fragment des Plasminogens, ist ein potenter Inhibitor der Angiogenese und vermag das Wachstum von Tumoren verhindern, indem es die Versorgung durch neu gebildete Blutgefäße unterdrückt. Die Ergebnisse von Moser zeigten, dass Angiostatin von der α/β - Untereinheit der endothelialen ATP Synthase gebunden wird und somit möglicherweise an dem antiangiogenetischen Effekt des Angiostatins beteiligt ist.¹⁰⁴ In der Literatur werden des Weiteren zahlreiche Inhibitoren mit antibiotischem Effekt beschrieben, die an der katalytischen β - Untereinheit der mitochondrialen H^+ -ATP Synthase angreifen.^{106, 107} Darüber hinaus konnten Salomon et al. durch Hemmung des F_0 -Teils mittels Oligomycin-Derivate eine starke antiproliferative Wirkung bei solchen Tumorzellen erzielen, die einem oxidativen Stoffwechsel aufweisen und keinen Warburg Effekt (Energiebedarfdeckung durch anaerobe Lactatverstoffwechselung) ausbilden.¹⁰⁸ Diese Befunde bieten hinreichende Anhaltspunkte, die ATP Synthase als mögliches Zielenzym der Darpone weiterführenden Untersuchungen zu unterziehen.

5.2.2.6 3,2-Trans-Enoyl-CoA Isomerase

Die 3,2-Trans-Enoyl-CoA Isomerase (auch Dodecenoyl-CoA Isomerase) ist eine Oxireduktase, welche die β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren einleitet, deren Doppelbindungen sich an ungeraden Positionen befinden.¹⁰⁹ In menschlichen Lebergewebe kommt sie in zwei Isoformen vor, wobei jedoch keine in Zusammenhang mit einer antiproliferativer Wirkung beschrieben wird.¹¹⁰ Es scheint daher nahe liegend, dass die Isolation des Enzyms aus OVCAR-8 Zellhomogenat durch die Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen, das Ergebnis von unspezifischen Wechselwirkungen mit der lipophilen Substratbindungsstelle ist.

5.2.3 Transkriptionsproteine

Anhand der Affinitätsuntersuchungen konnten fünf Proteine identifiziert werden, welche als Transkriptionsfaktoren, bzw. Aktivatoren die Expression bestimmter Gene beeinflussen.

5.2.3.1 FUSE Binding Protein 1 und 2

Die FUSE (Fare Upstream Element) Binding Proteine (FBP) bilden eine Familie von Transaktivatoren, welche spezifisch an bestimmte Sequenzen von Einzelstrang DNA binden und dadurch die Transkription verschiedener Gene stimulieren. Zu diesen gehört unter anderen das Protoonkogen *c-myc*,¹¹¹ welches bereits in Zusammenhang mit einer Überexpression von Glycolyseenzymen bei bestimmten Krebsformen in Kapitel 5.2.2.3 erwähnt wurde und Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten ist.^{90, 112} Ferner zeigten Mikrosequenzanalysen der Humanen DNA Helicase V (HDH V), dass dieses Enzym identisch mit dem FBP1 ist.¹¹³ Die HDH V ist ein äußerst potentes, jedoch in nur sehr geringen Mengen vorkommendes Enzym, welches im Zellkern unter ATP-Verbrauch den DNA-Doppelstrang zu Replikations- und Reparaturzwecken öffnet.¹¹⁴ Der Tatsache, dass beide FBPs aus Zellhomogenaten unterschiedlicher Spezies isoliert worden sind (FBP1 aus humanen MOLT-4 Zellen und FBP2 aus Schweinehirnextrakt) sprechen für eine spezifische Bindung der Proteine an die Struktur der Darpone in den Affinitätsuntersuchungen. Darüber hinaus geben die oben genannten Befunde einen möglichen Erklärungsansatz für die antiproliferative Aktivität der Darpone.

5.2.3.2 TBP-interactin protein 120 A

Das TBP (TATA-binding protein)-interactin protein 120 A (TIP120A) wurde erstmals von Tamura et al. in der Literatur beschrieben und kommt ubiquitär als Subtyp A und muskelspezifisch als Subtyp B vor.^{115, 116} TBP ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Interaktion mit weiteren Proteinen eine generelle Transkriptionregulation in eukariontischen Zellen ausübt.¹¹⁵ In vitro führt TIP120A zu einer allgemeinen Erhöhung der basalen, RNA Polymerase I-III vermittelten Transkriptionsrate.¹¹⁷ Eine Aussage über einen möglichen Zusammenhang mit der antiproliferativen Wirkung der Darpone ist aufgrund der geringen Datenlage bislang jedoch nicht möglich. Das Enzym wurde aus Schweinehirnextrakt isoliert.

5.2.3.3 Transcriptional Regulating Protein 132

Das Transcriptional Regulating Protein 132 (TReP-132) wurde aus der Nierenzelllinie HEK-293 isoliert und gehört zum C₂H₂ Subtyp der Zink Finger Proteine.¹¹⁸ In adrenalen Zellen reguliert es in Kombination mit dem Steroidogenetic Factor-1 die Expression vom Cytochrom P450_{sc}. Diese Oxidase katalysiert die Umsetzung von Cholesterol zum Pregnenolon, dem ersten Schritt in der Synthese aller Steroidhormone.¹¹⁹ Gizard et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression des TReP-132 in der humanen adrenalen Tumorzelllinie NCI-H295 zu einem Anstieg der Pregnenolonproduktion führt. Ferner beschreiben sie wachstumshemmende Eigenschaften, die auf TReP-132 induzierte Expression der natürlichen Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} beruhen.¹²⁰ Diese Eigenschaft steht jedoch im Widerspruch zu der Annahme, dass Darpone einen inhibitorischen Effekt auf die durch die Affinitätsuntersuchungen isolierten Enzyme besitzen würden.

5.2.3.4 Elongationsfaktor 3A

Der aus dem Hefezellextrakt isolierte Elongationsfaktor 3A (EF3A) ist ein für Pilze essentieller Transskriptionsfaktor, welcher die Anlagerung von Aminoacyl-

tRNA an die Ribosomkomplex stimuliert.¹²¹ Obwohl EF3A somit in Verbindung mit der ebenfalls aus Hefezellextrakt isolierten Alanyl-tRNA-Synthetase (siehe Kapitel 5.2.4.3) steht, kommt es nicht für die antiproliferative Wirkung der Darpone in Betracht, da kein funktionelles Analogon dieses Enzyms in Eukaryonten existiert.¹²²

5.2.4 Enzyme des Aminosäurestoffwechsels

Drei der aus den Affinitätsuntersuchungen isolierten Enzyme sind an Synthese und Stoffwechsel von Aminosäuren beteiligt.

5.2.4.1 Ketosäuren-Reduktoisomerase

Die Ketosäuren-Reduktoisomerase dient Mikroorganismen und Pflanzen zur Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin.¹²³ Es ist ein bifunktionales Enzym, welches über eine Isomerisierung mit anschließender Reduktion die Reaktion von 2-Hydroxy-2-methyl-3-ketobutyrat zu 3-Hydroxy-3-methyl-2-ketobutyrat in einem aktiven Zentrum katalysiert.¹²⁴ Da die aus Hefezelleextrakt isolierte Ketosäuren-Reduktoisomerase nicht im menschlichen Stoffwechsel vorkommt, wird es als mögliches Zielenzym der Darpone nicht weiter diskutiert.

5.2.4.2 Glutaminase

Die Glutaminase wurde aus Schweinehirnhomogenat isoliert und ist ein Enzym, welches aus seiner aktivierten phosphorylierten Form die Hydrolyse von L-Glutamin unter Abspaltung von Ammoniak zu L-Glutamat katalysiert.¹²⁵ Eine Reduktion der Glutaminaseaktivität kann durch Inaktivierung mittels 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin oder durch Antisense mRNA erfolgen.^{126, 127} Letztere führt in EATCs zu einer verminderten Produktion von Gluthathion (GSH) und erhöht gleichzeitig die Apoptoserate, wie Lora et. al in Untersuchungen belegen konnten. GSH ist ein Tripeptid, welches aus den Aminosäuren L-Glutamat, L-Cystein und L-Glycin gebildet wird und dem innerhalb der Zelle eine entscheidende Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress zukommt. Die Untersuchungen von Lora weisen auf eine selektive antiproliferative Therapiemöglichkeit durch gezielte Hemmung der Glutaminase hin, die als mögliche Erklärung für die Wirkung der Darpone in Betracht gezogen werden kann.¹²⁷

5.2.4.3 Alanyl-tRNA-Synthetase

Die Alanyl-tRNA-Synthetase gehört zur Familie der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die unter ATP-Verbrauch die Aktivierung und Verknüpfung von Aminosäuren mit den jeweiligen tRNA-Elementen katalysieren. Die Reaktionen erfolgen für jede Synthetase hochspezifisch und dienen der Bereitstellung von aktivierten Aminosäuren für die Elongationsphase der Translation.¹²⁸ Verschiedene antibiotische Stoffe können die Elongation in Bakterien beeinflussen und bakteriostatische oder bakterizide Effekte auf die Mikroorganismen ausüben. Zu den klassischen Hemmstoffen der ribosomalen Protein-Biosynthese gehören Tetracycline, Aminoglycoside, Erythromycin, sowie Chloramphenicol.¹²⁹ Informationen über Substanzen mit antiproliferativen Eigenschaften, die insbesondere auf Hemmung der Alanyl-tRNA-Synthetase beruhen, sind der Literatur zu diesem Zeitpunkt nicht zu entnehmen. Daher scheint das aus Hefezellextrakt isolierte Enzym als mögliches Target der Darpone nicht in Frage zu kommen. Jedoch ergeben sich interessante Aspekte durch die Verbindung zu der ebenfalls isolierten Puromycin-sensitiven Aminopeptidase (siehe Kapitel 5.2.5.1).

5.2.5 Peptidasen

Zwei Proteine, die im Rahmen der Affinitätsuntersuchungen identifiziert wurden, gehören zu der Klasse der Peptidasen und sind an regulatorischen bzw. katabolen Prozessen beteiligt.

5.2.5.1 Puromycin-sensitive Aminopeptidase

Die Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) wurde in den Affinitätsuntersuchungen aus Schweinehirnhomogenat isoliert. PSA hydrolysiert N-terminale Aminosäuren von Oligopeptiden und kommt sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern vor. Untersuchungen zeigen, dass die PSA möglicherweise an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt ist, indem sie den Abbau bestimmter regulatorisch wirksamer Proteine gewährleistet. So führt die Inhibition des Enzyms durch Puromycin oder Bestatin zur Wachstumshehmung und Apoptose durch einsetzende DNA-Fragmentierung.¹³⁰ Kakuta et. al beschrieben neuartige niedermolekulare, nicht-peptidische Inhibitoren der PSA mit IC₅₀-Werten im niederen mikromolaren Bereich. Die in vivo Untersuchungen an MOLT-4 Zellen zeigten jedoch keine signifikante Wachstumshehmung für Konzentrationen, die bei Puromycin zu einem 98% Absterben der Zellen führten. Die PSA-Hemmung kann demzufolge nicht allein für die antiproliferative Wirksamkeit des Puromycins verantwortlich sein. Daher postulierten Kakuta et al., dass zusätzlich eine Hemmung der Proteinbiosynthese aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Aminoacyl-tRNA (vergl. 5.2.4.3) und Puromycin erfolgt.¹³¹ Die Selektivitätsprofile der Darponleitstruktur **2B** und das des Puromycins (NSC-3055) unterscheiden sich jedoch mit einem Korrelationswert von -0,104 gravierend voneinander. Daher wird die Wechselwirkungen zwischen PSA und Darponen nicht als Hauptursache für deren antiproliferative Aktivität angenommen.

5.2.5.2 Pepsinogen C

Pepsinogen C (PGC) ist das inaktive Vorläuferprotein des Pepsin C, einem Vertreter der Aspartat-Endopeptidasen, welches jedoch bevorzugt Peptide mit aromatischen Resten spaltet.¹³² Im sauren Milieu des Magens von Vertebraten erfolgt nach Sezernierung die autokatalytische Umwandlung des PGC zum Pepsin C, während es im pH-Bereich von 7,2-7,4 der menschlichen Samenflüssigkeit in nativer Form zu finden ist, was die Affinitätsuntersuchungen bestätigten (vergl. Kapitel 4.4.3.4).^{132, 133} In T-47D Brustkrebszellen ist eine erhöhte PGC Expression zu beobachten, welche in Zusammenhang mit der hormonellen Regulation dieses Proteins gebracht wird.¹³⁴ Interaktionen mit dem EGF-Rezeptor werden in der Literatur dagegen nicht beschrieben. Eine Aussage, ob die Bindung des PGC in den affinitätschromatographischen Untersuchungen spezifisch erfolgte oder über Wechselwirkung mit lipophilen Arealen des Proteins, die später im Pepsin C die Anlagerung der zu hydrolysierenden aromatischen Aminosäuren erleichtern, kann an dieser Stelle nicht getroffen werden.

5.2.6 Weitere Enzyme ohne gemeinsame Klassenzugehörigkeit

Neben den beschriebenen Enzymen bestimmter Klassenzugehörigkeiten wurden mehrere Enzyme isoliert, welche sich nicht einer gemeinsamen Bestimmung zuordnen lassen.

5.2.6.1 Squalensynthese

Die Squalensynthese katalysiert in einer reduktiven Dimerisierung zweier Farnesyldiphosphate die Biosynthese von Squalen.¹³⁵ Diese Reaktion stellt einen Schlüsselschritt in der Cholesterolsynthese dar und bietet damit einen möglichen Ansatz für eine therapeutische Intervention bezüglich einer antiatherosklerotischen und Cholesterol-senkenden Wirkung.¹³⁶ Antiproliferative Effekte werden dagegen nicht in Zusammenhang mit der Squalensynthese in der Literatur beschrieben, weshalb unspezifische Wechselwirkungen mit lipophilen Bereichen des Enzyms als Ursache für die Ergebnisse der Affinitätsuntersuchungen mit dem verwendeten Hefezelleextrakt angenommen werden.

5.2.6.2 S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase

Die S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) Hydrolase ist ein Tetramer aus vier 47-48 kDa Untereinheiten, die jeweils ein Molekül NAD^+ als Co-Faktor binden. Das aus Hefezelleextrakt isolierte Enzym katalysiert die Freisetzung von Adenosin und L-Homocystein aus AdoHcy, welches ein potenter Inhibitor von verschiedenen Transmethyhasen ist.¹³⁷ Eine Hemmung dieser Hydrolase führt zu einem erhöhten AdoHcy und S-Adenosyl-L-Methionin-Spiegel, der für die Zellteilung wichtige Transmethylierungsprozesse unterdrückt.¹³⁸ Verschiedene Adenosyl-analoge Inhibitoren der AdoHcy Hydrolase mit cytotoxischen und antiviralen Effekten sind in der Literatur bereits beschrieben worden.^{138, 139} Obwohl die AdoHcy Hydrolase nicht in Zusammenhang mit dem EGF-Rezeptor in der Literatur erwähnt wird, bieten die beschriebenen Effekte einer Inhibition Anlass für weiterführende Untersuchungen dieses Enzyms.

5.2.6.3 65 kDa Untereinheit A der Serin/Threonin Proteinphosphatase 2A

Proteinphosphatasen (PP) hydrolysieren die von Protein-Kinasen an Aminosäurereste angehefteten Phosphatreste und nehmen auf diese Weise Einfluss auf die inter- und intrazellulären Abläufe in eukaryotischen Zellen.¹⁴⁰ Die Serin/Threonin-spezifische PP2A umfasst eine große Familie von Holoenzymen, welche sich aus drei Untereinheiten zusammensetzen. Die isolierte Untereinheit A bildet als Gerüstkomponente zusammen mit der katalytischen Untereinheit C das Kernenzym, welches sich wiederum mit diversen B-Untereinheiten vereinigen kann. Durch die Isoformen der Untereinheiten A und C ergeben sich hierdurch insgesamt 75 mögliche Kombinationen des Enzymkomplexes, was zu einer großen Substratbreite der PP2A führt, die durch die B-Untereinheiten bestimmt wird.¹⁴¹ Zu den Targets zählen zahlreiche Enzyme der Glycolyse und Proteinbiosynthese sowie Enzyme des Leberstoffwechsels.¹⁴⁰ Für die Aktivität des PP2A ist der Phosphorylierungszustand des Tyrosins³⁰⁷ der Untereinheit C von entscheidender Bedeutung. So führt die EGF- oder Insulin-induzierte Phosphorylierung an dieser Position zu einer Inaktivierung der PP2A. Diese kann ebenfalls durch Okadaiksäure erfolgen, welche PP2A im nanomolaren Bereich hemmt und bei verschiedenen Tumorarten ein verstärktes Zellwachstum bewirkt. Eine weitere Möglichkeit der post-translationalen Modifikation der PP2A ist die Methylierung spezifischer Aminosäuren der Untereinheits B und C, wogegen die Untereinheit A nach bisherigen Erkenntnissen nicht regulatorisch beeinflusst wird.¹⁴¹ Die aufgeführten Befunde sprechen gegen die Vermutung, dass der antiproliferative Effekt der Darpone über die Inhibition der in den Affinitätsuntersuchungen isolierten 65 kDa Untereinheit A vermittelt wird.

5.3 Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Die Ergebnisse der IVCLSP-Testungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Darpone zeigten, dass eine Einführung von solubilisierenden Seitenketten unter Erhalt der antiproliferativen Aktivität möglich ist. Die durchgeführten Matrix-COMPARE-Analysen für diese Gruppe und die der Hydroxylgruppen-haltigen Zwischenverbindungen **32** ergaben Selektivitätsprofile, die stark von dem der Leitsubstanz **2B** abwichen. Da die mittlere antiproliferative Aktivität der Substanzen in der Regel erhalten blieb, deuteten die Untersuchungen darauf hin, dass die Wirkung der funktionalisierten Darpone wahrscheinlich auf einem anderen Mechanismus als dem der Leitstruktur **2B** beruhte. Deshalb bleibt unklar, ob die in den Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Darponen adsorbierten Proteine dem Targetprofil der typischen Darpone überhaupt entsprechen können.

Für die bislang vorgenommenen Testungen am HSP90, welches aufgrund der viel versprechenden Dockingexperimente als ein aussichtsreiches Target erschien, wurden daher neben den typischen Darponen auch Vertreter der löslichen Gruppe ausgewählt. Da jedoch keine Verbindung Wirkung unterhalb einer 50-100 μ molaren Konzentration in dem SKBr-3 Testsystem zeigte, deutete dieses auf unspezifische, lipophile Wechselwirkungen als Ursache für die Adsorption des Enzyms am immobilisierten Darpon hin.

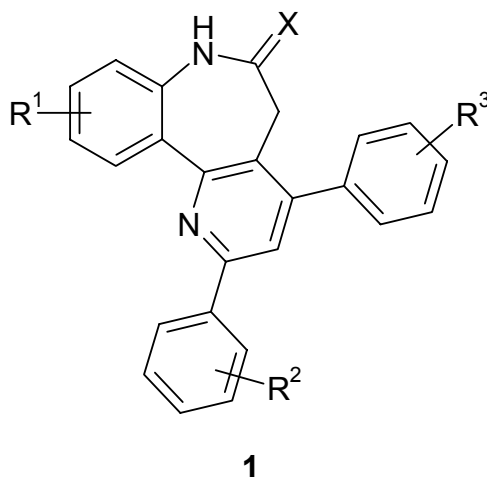
Die Gruppe der aufgeführten Chaperone, welche neben dem HSP90 auch das Importin β enthielt, kam daher für weiterführende Untersuchungen nicht mehr in Betracht. Die Auswertung der recherchierten Literaturdaten der identifizierten Proteine zeigte ferner für die Peptidasen (PSA und PGC), die Transkriptionsfaktoren FBP2, TIP120A, TRep-132 und EF3A, die Ketosäuren-Reduktoisomerase, Anly-tRNA-Synthetase, 3,2-Trans-Enoyl-CoA Isomerase, Squalensynthase und PP2A keine offensichtlichen Zusammenhänge, welche die antiproliferative Wirkung der Darpone eindeutig klären könnten. Dagegen ergaben die Informationen über die Enzyme der Glycolyse (PFK-1, GAPDH und Enolase 1) einen möglichen Erklärungsansatz für die Beziehung zwischen dem Expressionsmuster des EGFR stimulierenden Faktors TFG- α und der

Antitumoraktivität der Darpone. Diese Anhaltspunkte rechtfertigen, unter Einbeziehung der ATP Synthase, weiterführende Untersuchung der Darpone bezüglich ihrer Wirkung auf den Energiestoffwechsel in Tumorzellen. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass inhibitorische Effekte auch über eine Interaktion mit Protein/Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden können, wie es Beitner et al. am Beispiel der PFK1-Hemmung durch Clotrimazol-induzierte Enzymablösung vom Zytoskelett beschrieben haben.^{95, 96} Mit der Durchführung von Standardassays am isolierten Enzym lässt sich diese Art von Inhibition nicht nachweisen. Darüber hinaus ist es fraglich, ob Untersuchungen an isolierten Enzymen den in den Affinitätsuntersuchungen zahlreich aufgetretenen Wechselwirkungen der Darpone mit Proteinen gerecht werden würden.

Nicht im direkten Zusammenhang mit dem EGFR stehen nach Literaturrecherche die antiproliferative, bzw. cytotoxische Wirkung bei Hemmung der TK, Glutaminase und AdoHyc Hydrolase. Dennoch sollen sowohl für diese Enzyme als auch für die HDH V Untersuchungen erfolgen, die zur endgültigen Aufklärung des Wirkmechanismus der Darpone beitragen könnten.

6 Zusammenfassung *

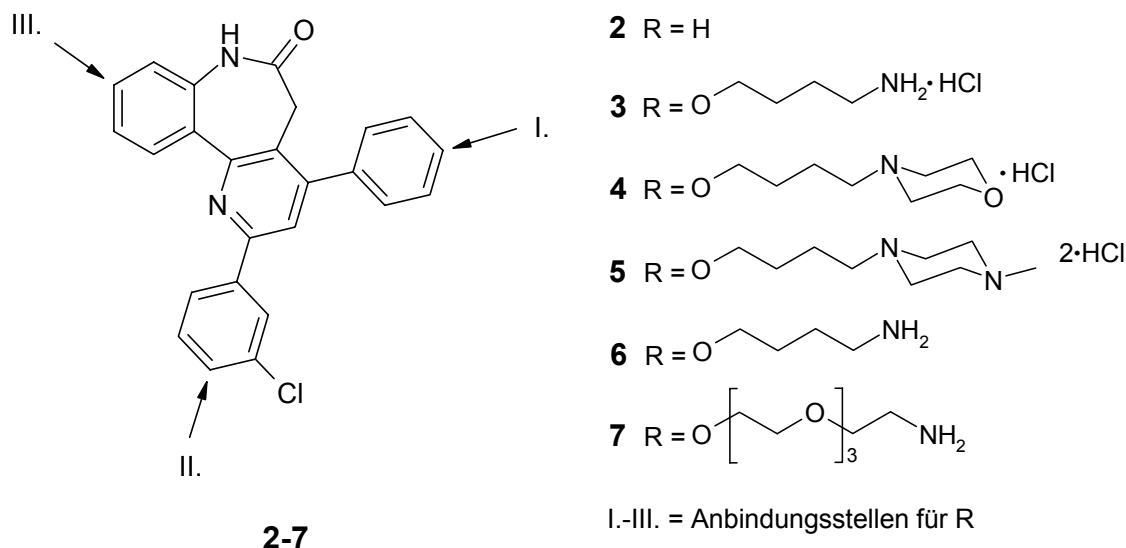
Darpone (= 2,4-Diaryl-5*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6(7*H*)-one, **1**) zeigen im *in vitro* Antitumor Drug Screening (ADS) des National Cancer Institutes (NCI) eine ausgeprägte antiproliferative Aktivität mit Selektivität für bestimmte Zelllinien. Die Selektivitätsmuster der Darpone im NCI-Antitumorscreening unterscheiden sich erheblich von denen gängiger antiproliferativer Stoffe, weshalb ein bekannter Mechanismus ausgeschlossen wird. Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsprofil von TGF- α in Tumorzellen und dem Selektivitätsmuster bestimmter Darponvertreter, dessen Ursache experimentell bisher nicht aufgeklärt werden konnte.



Aus der Familie der Darpone wurde mit Hilfe des Matrix-COMPARE-Algorithmus eine Verbindung mit charakteristischem Wirkprofil ermittelt, die als Leitstruktur (**2**) für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten chemischen Modifikationen diene. Ein Ziel war die Synthese wasserlöslicher Derivate, die sich für eine Erprobung in weiterführenden Tiermodellen eignen. Die Einführung stickstoffhaltiger Seitenketten in Position I., II. und III. erbrachten eine stark verbesserte Wasserlöslichkeit der Verbindungen unter Erhalt der antiproliferativen Wirkung. COMPARE-Analysen der Verbindungen **3-5** und der hydroxysubstituierten Zwischenverbindungen zeigten jedoch, dass das darpontypische Selektivitätsprofil mit Einführung der hydrophilen Substituenten verloren geht.

* Die Nummerierung der in der Zusammenfassung aufgeführten Strukturen weicht von der Nummerierung im restlichen Teil der Arbeit ab.

Im Folgenden wurden die synthetisierten Aminoverbindungen **6** und **7** für Affinitätsuntersuchungen an Trägermaterialien gekuppelt und mit verschiedenen Zell- und Gewebehomogenaten inkubiert.

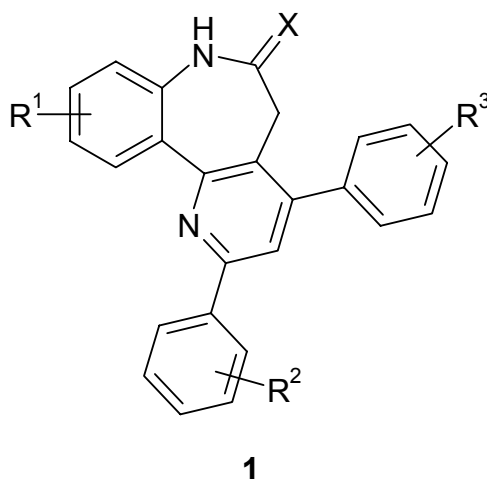


Aufgrund der exponierten aromatischen Reste der Darponstruktur kam es bei den Experimenten zu zahlreichen unspezifischen Proteinadsorptionen durch lipophile Wechselwirkungen. Diese konnten durch den Einsatz von 1-Naphtholkörpern, die ebenfalls über Linkermoleküle an Trägermaterialien gekoppelt und mit Extrakten inkubiert wurden, verifiziert und von den spezifischen Proteinbindungen unterschieden werden. Differenzen in den Proteinbandenmustern in Abhängigkeit der Anbindungsstellen I.-III. und Auslöschung einzelner Banden durch Vorinkubation der Extrakte mit der aktiven Leitstruktur **2** wurden als weitere Kriterien für die Identifizierung spezifischer Proteinbanden im Elektropherogramm herangezogen.

Es gelang Proteine verschiedener Klassifizierung zu isolieren. Erste Experimente mit dem Heat-Shock-Protein 90 β widerlegten eine spezifische Hemmung dieses möglichen Targets der Darpone. Des Weiteren wurden Enzyme des Energiestoffwechsels identifiziert, die im Zusammenhang mit einer EGFR vermittelten antiproliferativen Wirkung stehen.

Summary *

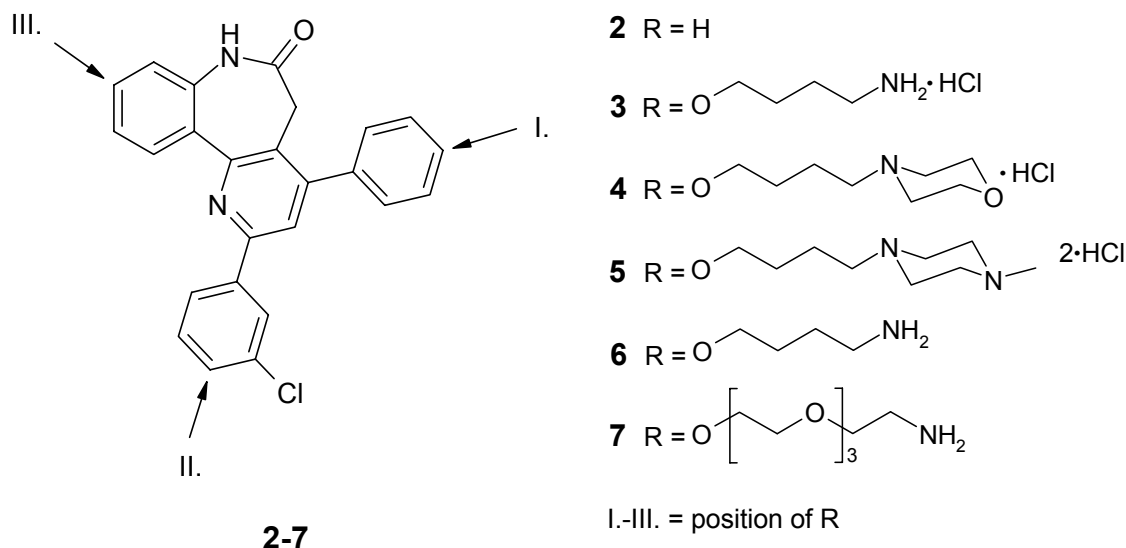
Darpones (2,4-diaryl-5*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6(7*H*)-ones, **1**) are a family of antiproliferative agents exhibiting a characteristic selectivity pattern for certain cell lines in the Antitumor Drug Screen (ADS) of the National Cancer Institute (NCI). Because the selectivity patterns of the darpones differ substantially from those of current antiproliferative compounds, a known mechanism of antiproliferative activity can be excluded. The observation of a relationship between the expression levels of TGF- α in tumor cells and the selectivity pattern of some darpones has not been verified experimentally so far.



With assistance of the matrix COMPARE algorithm a compound with a characteristic selectivity profile was determined from the darpone family. The acquired darpone **2** served as a lead structure for the following chemical modifications. One intention was the synthesis of water-soluble derivatives, which are suitable for further animal experiments. The introduction of aminoalkyl side chains into position I., II. and III. effects an improved water solubility of the darpones, while the antiproliferative activity is preserved. COMPARE analyses of the structures **2-5** and the hydroxy-substituted intermediates showed a loss of the darpon characteristic selectivity profile by introduction of the hydrophilic substituents.

* The numeration of the summary does not correspond to the numbers used in the other chapters of this work.

In the following, the synthesized amino darpones **6** and **7** were immobilized on solid matrices, which were employed in fishing experiments with cell and tissue homogenates, aiming to identify proteins with affinity for darpones.



Due to the exposing aromatic residues of the darpone structure, the experiments exhibited numerous nonspecific protein adsorptions as a result of lipophilic interactions. These effects could be verified and excluded from the specific protein bands by the use of 1-naphtholmatrices, which comprised the same linker molecules like the darpones **6** and **7**. Further criteria for the identification of a specific protein binding were the distinction of the pattern in dependence on the linker position I.-III. and the extinction of discrete bands by pre-incubation of the homogenates with the active lead structure **2**.

By means of these criteria proteins of different classification were isolated. First experiments with the heat shock protein 90 β disproved a specific inhibition of this potential target by the darpones. Furthermore enzymes of the energy metabolism were identified, which are closely related to an EGFR mediated antiproliferative effect.

7 Experimenteller Teil

7.1 Versuche zu Kapitel 3

7.1.1 Allgemeines

Schmelzpunkte

Electrothermal 1A 9100, Barnstead International

IR-Spektren

Die Vermessung von Festsubstanzen erfolgt als KBr-Pressling, die von Ölen auf einem Natriumchloridkristall.

PU 9712 Infrared Spectrophometer, Philips (Institut für Pharmazie der Universität Hamburg);

Nicolet FT-IR 200, Thermo Nicolet (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig)

¹H-NMR-Spektren

Bruker AMX 400 (400 MHz); (Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg); Bruker AM-400; Bruker Avance DRX-400 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig) Lösungsmittel: [D₆]-DMSO; Innerer Standard: Tetramethylsilan; Angabe der chemischen Verschiebungen mit δ -Werten (ppm); Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett; b = vorliegendes Signal tritt verbreitert auf. Die Angabe einer Signalmultiplizität in Anführungszeichen bedeutet, dass die im Spektrum sichtbare Aufspaltung des Signals von der zu erwartenden Multiplizität aufgrund der Auflösung des Spektrums abweicht.

¹³C-NMR-Spektren

Bruker AMX 400 (100.6 MHz) (Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg); Bruker AM-400, Bruker Avance DRX-400 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig) Lösungsmittel: [D₆]-DMSO; Innerer Standard: Tetramethylsilan; Angabe der chemischen Verschiebungen mit δ -Werten (ppm),

der Zusatz (2x) weist auf ein überlagertes Signal magnetisch äquivalenter ^{13}C -Kohlenstoffatome hin. Die Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt und zusätzlich als DEPT-Spektrum, bzw. als PENDANT-Spektrum aufgenommen.

Elementaranalysen

Heraeus CHN-O-Rapid, (Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg); C-H-N-O Elemental Analyser 1106, Carlo Erba; CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elemental Analyser, Fa. Thermo Quest (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig); Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Massenspektren

VG 70-250S, VG Analytical, Manchester, U.K. Xenon-FAB-Kanone90 (Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg); Finnigan-MAT 8400-MSS I und Finnigan-MAT 90 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig). Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV; Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS; hochauflösendes Massenspektrum (HRMS).

Dünnschichtchromatographie

Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel, 40 x 80 mm.

Säulenchromatographie

Adsorption der Substanzen an Kieselgel 100-200 aktiv, 60 Å, ICN; Säulenfüllung: Kieselgel 60 (unter 0.063 mm), Merck. Säulendurchmesser: 2 cm, Füllhöhe: 10 cm.

Analytische Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Elite LaChrom Anlage von Firma Merck/Hitachi: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000; Trennsäule Merck LiChroCART 125-4, LiChrosphere 100, RP 18, 5 µm; Probenvorbereitung: Lösen von 1 mg Substanz in 1000 µl DMSO. 100 µl dieser Stammlösung werden mit DMSO zu 1000 µl ergänzt. Die gemessene Adsorption sollte in

einem Bereich von 300 bis 800 mAU liegen. Bei abweichenden Werten wird die Stammlösung entsprechend weniger bzw. stärker verdünnt, bis der gewünschte Adsorptionsbereich vorliegt; Flussrate: 1.000 ml/min, isokratisch; Injektionsvolumen: 10 µl; Detektion: (DAD) bei 254 und 280 nm; Auswertung: 100%-Methode, die Angabe der Absorptionsmaxima (= Lambda Max) erfolgt anhand der aus den im Peakmaximum mittels DAD gewonnenen UV-Spektren, Software EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3, Integrationsausschluss 1.5 min, Threshold 50, Gesamtlaufzeit: 15 min, Nettoretentionszeit (t_s), Totzeit (t_m) bezogen auf DMSO; Herstellung H_2O+TFA (pH 1.5): Aqua bidest. wird mit Trifluoressigsäure auf pH 1.5 eingestellt. Herstellung $H_2O+(Et_3NH)_2SO_4$ (pH 2.0): 20 ml Triethylamin, 1765 µl Methansulfonsäure und 242 mg Natriumhydroxid werden mit Aqua bidest. zu 1000 ml gelöst und mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.0 eingestellt.

Röntgenstrukturanalyse

Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K α -Strahlung gemessen. Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten sind den analytischen Daten der entsprechenden Verbindung zu entnehmen.

Trocknung von Lösungsmitteln

Die Trocknung der verwendeten Lösungsmittel erfolgt in Anlehnung an publizierte Methoden.¹⁴²

Toluen: 1 l Toluol wird in einem 2l Rundkolben mit Wasserabscheider, Kühler und Trockenrohr so lange zum Rückfluss erhitzt, bis das Kondensat im Wasserabscheider nicht mehr getrübt ist. Dieses sollte bei Bedarf ein bis zweimal abgelassen werden. Nach dem Abkühlen wird 10 g wasserfreies Calciumchlorid hinzu gegeben und erneut 1 h zum Rückfluss erhitzt. Das Kondensat wird anschließend über eine Destillationsbrücke aufgefangen, wobei der Vorlauf zu verwerfen ist. Die Destillation wird abgebrochen, sobald das

Calciumchlorid gerade noch mit Toluol bedeckt ist. Das getrocknete Toluol wird über regeneriertem Molekularsieb (4 Å) gelagert.

Aceton und Dichlormethan: 50 ml Lösungsmittel und 2.5 g wasserfreies Kaliumcarbonat werden in einen 100 ml Kolben gefüllt. Zwischen Kolben und Kühler mit Trockenrohr wird ein Tropftrichter mit Druckausgleich installiert, dessen Hahn nach 2 h Erhitzen zum Rückfluss zugezogen wird. Nach den ersten 5 ml Destillat wird die Heizquelle entfernt und der Vorlauf verworfen. Danach wird die Destillation so lange fortgesetzt, bis das Kaliumcarbonat gerade noch mit Lösungsmittel bedeckt ist. Das getrocknete Lösungsmittel wird im direkten Anschluss eingesetzt.

DMSO und THF: Das entsprechende Lösungsmittel wird über regeneriertem Molekularsieb (4 Å) gelagert.

Regenerierung des Molekularsiebs: Das gebrauchte Molekularsieb wird mit destilliertem Wasser portionsweise gewaschen, bis kein Geruch des Lösungsmittels mehr wahrzunehmen ist. Nach Abtrennen des restlichen Waschwassers wird es bei 250 °C im Trockenschrank zur Massekonstanz erhitzt.

7.1.2 Synthesen und Analytische Daten

AVV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Umsetzung von Anilinen mit Bernsteinsäureethylesterchlorid:

Zu einem gekühlten Gemisch aus 180 mmol Anilinverbindung, 20 ml Pyridin und 75 ml Toluol wird unter Rühren eine Lösung von 218 mmol (36.0 g) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 25 ml Toluol langsam zugetropft. Die entstandene Suspension wird 2 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 30 ml Wasser versetzt. Die wässrige Phase wird mit einem Scheidetrichter abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird nacheinander mit 30 ml 10proz. Salzsäure und 30 ml 5proz. Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der Methoxy-2,3,4,5-tetrahydro-1H-[1]benzazepin-2-one (**10**)

In einem Dreihalskolben mit Thermometer und Gasableitung werden 4400 mg (25 mmol) Methoxytetralon in 17.5 ml Eisessig gelöst. Unter Rühren trägt man erst 3190 mg Natriumazid ein und lässt dann, im Laufe einer Stunde, 5.6 ml konzentrierte Schwefelsäure in die Suspension eintropfen, wobei die Temperatur durch Außenkühlung mit Wasser auf 25-30 °C zu halten ist. Anschließend wird das Gemisch auf 50-60 °C erwärmt und, nachdem es sich wieder abgekühlt hat, vorsichtig auf 185 ml 10proz. Natriumcarbonat-Lösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt und umkristallisiert.³²

AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Umsetzung der Anilide **15a,b** und **21a,b**

Methode A: Eine Mischung von 1 mmol Anilin-4-oxo-butancarbonsäure **15** oder 1 mmol Anilin-4-oxo-butancarbonsäureethylester **21** mit 1.51 g Polyphosphorsäure (hergestellt aus 1.0 g Phosphorpentoxid und 0.3 ml Phosphorsäure) und 2 ml Eisessig wird 2 h auf 95-100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das

Reaktionsgemisch auf Eis gegeben und für weitere 2 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Ethanol umkristallisiert.

Methode B: 1 mmol Anilin-4-oxobutancarbonsäure **15** oder 1 mmol Anilin-4-oxobutancarbonsäureethylester **21** wird in einer Lösung aus 64 mg Phosphorpentoxid und 1.3 ml Methansulfonsäure bei 70-80 °C erhitzt, bis keine Eduktflecken im Dünnschichtchromatogramm zu detektieren sind. Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und 1 h weiter gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Ethanol umkristallisiert.

AAV 4 : Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Chalkone **28**

25 mmol des jeweiligen Acetophenonderivats **29** werden in 10 ml Ethanol gelöst und mit 25 mmol frisch destillierter Benzaldehydkomponente **30** gerührt. Eine Lösung von 70 mg (1.25 mmol) Kaliumhydroxid in 1.25 ml Wasser wird hinzugegeben und 15 min im Eisbad und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 2 h gerührt. Die entstandene Suspension wird mit Eisessig neutralisiert, der Niederschlag abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

AAV 5: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der hydroxysubstituierten 2,4-Diaryl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-one **32**

427 mg (1 mmol) eines methoxysubstituierten 2,4-Diaryl-5H-pyrido[3,2-d]-1-benzazepin-6(7H)-ons **35** wird in 10 ml trockenem Dichlormethan vorgelegt und unter Rühren mit 1002 mg (4 mmol) Bortribromid versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur werden 10 ml Wasser zugegeben und 1 h weiter gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethylacetat umkristallisiert.

AAV 6a: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 4-(3-Oxo-1,3-diaryl-propyl)1*H*-1-benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dione **33a** und **33c**

Eine Suspension von 2 mmol des jeweiligen 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dions **3**, 2 mmol der entsprechenden Chalkonkomponente **28** und 0.2 mmol Lithiumhydroxid in 7 ml trockenem THF (peroxidfrei) wird bei Raumtemperatur so lange gerührt, bis auf dem Dünnschichtchromatogramm keine Fluoreszenzminderung durch die Edukte mehr zu detektieren ist. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz mit Essigsäure neutralisiert und auf 50 ml Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wird dreimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingengt. Das resultierende Öl wird mit 7 ml Ethanol versetzt und gerührt bis eine Suspension entsteht. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit kaltem Wasser und Ethanol gewaschen. Das Produkt wird ohne Aufarbeitung weiter verwendet.

AAV 6b: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 4-(3-Oxo-1,3-diaryl-propyl)1*H*-1-benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dione **33b** und **33d**

Zu einer Lösung von 2 mmol 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dions **3** und 2 mmol der angegebenen Chalkonkomponente **28** in 7 ml Ethanol wird 0.2 mmol Kaliumhydroxid gegeben und bei Raumtemperatur so lange gerührt, bis auf dem Dünnschichtchromatogramm keine Fluoreszenzminderung durch die Edukte mehr zu detektieren ist. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz mit Eisessig auf pH 5 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit kaltem Wasser und Ethanol gewaschen. Das Produkt wird ohne Aufarbeitung weiter verwendet.

AAV 7: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 2,4-Diaryl-5*H*-pyrido[3,2-*d*]-1-benzazepin-6(7*H*)-one **35**

447 mg (1 mmol) des entsprechenden *Michael*-Addukts **33**, 1 g (2.07 mmol) Ammoniumeisen(III)sulfat-Dodecahydrat und 1.2 g (15.57 mmol) Ammonium-

acetat in 7.5 ml Eisessig werden 3 h unter Stickstoffbegasung zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch auf 10 g zerstoßenes Eis gegossen und gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

AAV 8: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der Darponoxybutylbromide **48**

1 mmol des hydroxysubstituierten 2,4-Diaryl-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-ons **32** wird in 10 ml Aceton suspendiert und mit 138 mg (1 mmol) Kaliumcarbonat 30 min zum Rückfluss erhitzt. 2159 mg (10 mmol) 1,4-Dibrombutan (**43**) werden auf einmal hinzu gegeben und so lange weiter erhitzt, bis auf dem Dünnschichtchromatogramm keine Fluoreszenzminderung durch das Edukt mehr zu detektieren ist. Der Ansatz wird nach dem Abkühlen auf 100 ml Ethylacetat gegossen und dreimal mit 20 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das resultierende Öl wird in 2-3 ml Dichlormethan aufgenommen. Das Produkt wird unter starkem Rühren durch Zugabe von 50 ml Petrolether gefällt, abgesaugt und mit Petrolether gewaschen.

AAV 9: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der Darponoxybutylphthalimide **37**

1.0 mmol der brombutoxysubstituierten Verbindung **48** wird in 7.5 ml DMSO gelöst und bei 80 °C gerührt. 222 mg (1.2 mmol) Phthalimid-Kalium **42** wird hinzu gegeben und so lange weiter gerührt, bis auf dem Dünnschichtchromatogramm keine Fluoreszenzminderung durch das Edukt mehr zu detektieren ist. Nach Beendigung der Reaktion wird auf 50 ml Wasser gegossen, der entstandene Niederschlag abgesaugt, getrocknet und aus Ethanol oder Ethylacetat umkristallisiert.

AAV 10: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der Darponoxybutylamine **49**

154 mg (0.25 mmol) des Darponoxybutylphthalimids **37** wird in 5 ml Ethanol suspendiert, mit 25 mg (0.5 mmol) Hydrazinhydrat versetzt und 2 h unter Stickstoff zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz im Vakuum bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 25 ml 1 N Natronlauge 30 min gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, in einer Mischung von Dichlormethan/Diethylamin (9:1) gelöst und für die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel adsorbiert (Elutionsmittel: Dichlormethan, Methanol, Diethylamin: 85/14/1; Säulenfüllhöhe 20 cm).

AAV 11: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der Darponoxybutylamin Hydrochloride **50**

Das jeweilige Darponoxybutylamin **49** wird Ethanol suspendiert und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 1 gebracht und 30 min gerührt. Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert.

AAV 12 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der tertiären Darponoxybutylaminverbindungen **51** und **52**:

0.5 mmol der brombutoxysubstituierten Verbindung **48** werden in 5 ml DMF gelöst und mit 1.0 mmol Morpholin, bzw. N-Methylpiperazin bei 80 °C unter Stickstoffbegasung gerührt bis auf dem Dünnschichtchromatogramm keine Fluoreszenzminderung durch das Edukt mehr zu detektieren ist. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz im Vakuum einrotiert und der Rückstand in 15 ml 1 M Salzsäure gelöst. Es wird zweimal mit 15 ml Ethylacetat gewaschen. Die organischen Phasen werden verworfen. Die wässrige Phase wird mit 15 ml 1 M Natronlauge neutralisiert, mit Kaliumcarbonat alkalisiert und für 30 min gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Nach dem Trocknen wird der Niederschlag in 25 ml Ethanol gelöst. Die Lösung wird mit konz. Salzsäure auf pH1 eingestellt

und im Vakuum eingeeengt. Der resultierende Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

AAV 13: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der Darponoxypolyethylenphthalimide **58**:

0.5 mmol des jeweiligen hydroxysubstituierten 2,4-Diaryl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-ons **32** und 138 mg (1.0 mmol) Kaliumcarbonat werden in 4 ml Acetonitril suspendiert und 30 min zum Rückfluss erhitzt. Eine Lösung von 286 mg (0.6 mmol) Polyoxyethylenlinker **53** in 4 ml Acetonitril wird auf einmal hinzugegeben und weiter zum Rückfluss erhitzt, bis auf dem Dünnschichtchromatogramm kein Edukt mehr zu detektieren ist. Der Ansatz wird im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase mit jeweils 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung, 1 M Salzsäure und wieder gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird die organische Phase einrotiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Gradienteneluent von Ethylacetat-Petrolether 1:1 zu reinem Ethylacetat).

AAV 14: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der Darponoxypolyethylenamine **59**:

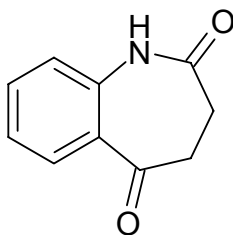
0.25 mmol des entsprechenden Darponoxypolyethylenphthalimids **58** und 30 mg (1.5 mmol) Hydrazinmonohydrat werden in 5 ml Methanol zum Rückfluss erhitzt, bis auf dem Dünnschichtchromatogramm kein Edukt mehr zu detektieren ist. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 5 ml Dichlormethan für eine Stunde gerührt. Das unlösliche Phthalsäurehydrazid (**47**) wird abfiltriert und die Lösung über Nacht bei -17°C gelagert. Der erneut gebildete Niederschlag wird abermals abgetrennt und die organische Phase zweimal mit 1 M Natronlauge ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

AAV 15: Vorschrift zur Bestimmung der Sättigungskonzentration in wässriger Lösung der Aminobutoxydarpon Hydrochloride **50a,b** und **c** mittels HPLC:

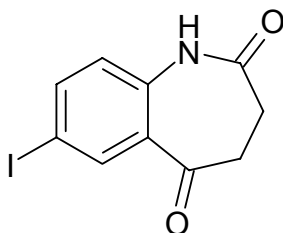
Jeweils 1.000 mg der zu vermessenden Substanzen und 1000 µl Aqua bidest werden 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 2 h bei 5000 rpm zentrifugiert, so dass man einen klaren Überstand über dem verbleibenden Bodensatz erhält. 500 µl des Überstandes werden entnommen und durch einen Filter mit einer Porenweite von 0.2 µm in ein HPLC-Probengefäß gegeben. Die erhaltene Lösung wird direkt mittels der HPLC vermessen. Als Elutionsmittel wird ein Gemisch aus 75 Teilen Acetonitril und 25 Teilen Wasser/TCA (pH 1-2) verwendet. Für die Herstellung der Referenzlösungen wird jeweils 1.000 mg Substanz genau eingewogen und zu 1.000 ml in DMSO gelöst. Anhand des Chromatogramms werden die Flächeninhalte der ermittelten Signale bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt und anschließend mit denen der jeweiligen Referenzlösung und Einwaagen ins Verhältnis gesetzt. Die so ermittelten Sättigungskonzentrationen sind in der Tabelle 8-3 wiedergegeben.

AAV 16: Untersuchung von Reaktionsgemischen der Verbindungen **33** und **34** auf vorliegende Isomerenverhältnisse mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie:

1-2 ml des Reaktionsgemisches werden in 10 ml Wasser gegeben. Der pH-Wert wird mit Eisessig auf pH 6 eingestellt und die wässrige Phase dreimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in deuteriertem DMSO gelöst und ^1H -NMR-spektroskopisch vermessen. Das Isomerenverhältnis wird durch Vergleich der Lactam- oder Hydroxylprotonen-Signalintensitäten errechnet. Das 3-(3-Chlorphenyl-4-methoxy)- und das 8-Iod-substituierte Benzo-[b]-cyclopenta[e]-azepindion **34b** und **34d** wurde jeweils anhand der für die Verbindungsklasse typischen chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmuster der Lactam- und Hydroxylprotonen im ^1H -NMR-Spektrogramm identifiziert,⁴⁸ ohne dass eine Isolierung der Reinsubstanz erfolgte.

3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (3a)

2.5 g (10 mmol) 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**7a**) werden mit 0.35 ml Wasser in 25 ml DMSO bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Nach 1 h und nach 3 h werden abermals 0.35 ml Wasser zugegeben. Nach ca. 4 h lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt in 200 ml Wasser. Das Gemisch wird 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petroläther gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol. Man erhält 1.4 g (78%) farblose Kristalle. Schmp.: 187 °C (Lit.¹⁴³: 187-188 °C).

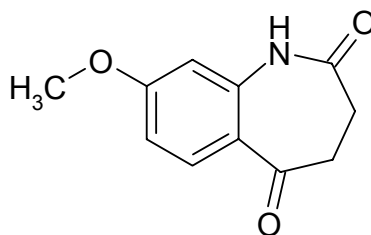
7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (3b)

3.73 g (10.0 mmol) 5-Hydroxy-7-iod-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**7b**) werden unter Stickstoffatmosphäre in 100 ml Dimethylsulfoxid unter Zusatz von 0.5 ml Wasser bei 150 °C gerührt. Nach 1 h und nach 3 h werden abermals 0.5 ml Wasser zugegeben. Nach ca. 4 h lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt in 200 ml Wasser. Das Gemisch wird 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit

Wasser und Petrolether gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol. Man erhält 2.13 g (71 %) beigefarbene Kristalle.

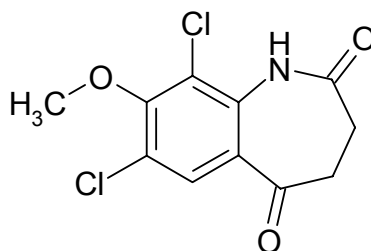
Schmp.: 215 °C (Lit.¹⁴⁴: 217°C).

8-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (3c)



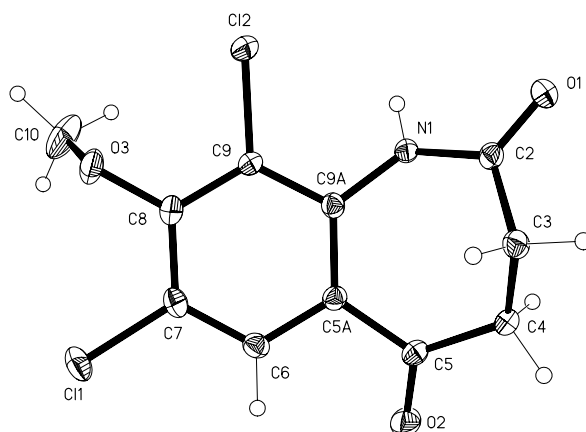
Zu einer Lösung von 1075 mg (5.56 mmol) 8-Methoxy-1,3,4,5-tetrahydro-[1]benzazepin-2-on (**10c**) in 17 ml *tert.*-Butanol werden 50 ml Wasser, 5275 mg (33.6 mmol) Kaliumpermanganat und 8.6 g (33.6 mmol) Magnesiumnitrat-hexahydrat hinzugefügt. Die Lösung wird zunächst 3 h unter Eiskühlung und im Anschluss in einem Wasserbad für weitere 17 h gerührt (für die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle wird ein Elutionsmittel aus Toluol und Ethylacetat im Verhältnis 1:1 verwendet, dem ein Anteil von 1% Ameisensäure beigemischt wird). Der Ansatz wird unter Kühlung mit einer Wasserstoffperoxid-Schwefelsäurelösung (hergestellt aus 10 ml Wasserstoffperoxid-Lösung 30%, 10 ml konz. Schwefelsäure und 80 ml Aqua dem.) titriert, bis sich der Ansatz von braun nach hellgelb verfärbt. Die wässrige Phase wird drei Mal mit 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Vereinigung der organischen Phasen wird mit gesättigter Natriumcarbonatlösung und anschließend mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 508 mg (44 %) farblose Kristalle.

Schmp: 204 °C (Lit.³¹: 205°C).

7,9-Dichlor-8-methoxy-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (3f)

Zu einer Lösung von 1957 mg (10.2 mmol) 8-Methoxy-4,5-dihydro-1H-[1]benzazepin-2(3H)-on (**10c**) in 30 ml *tert.*-Butanol werden 90 ml Wasser, 9.61 g Kaliumpermanganat und 15.6 g Magnesiumnitrathexahydrat hinzugefügt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einem Wasserbad für 20 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird unter Kühlung mit 60 ml 10proz. Salzsäure versetzt. Anschließend wird so lange Natriumbisulfit hinzugefügt, bis sich der Ansatz von braun nach hellgelb verfärbt und die Bildung eines Niederschlags beginnt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei 5 °C aufbewahrt. Anschließend wird der Niederschlag abgesaugt und **3f** aus dem Produktgemisch von **3c** mittels Säulenchromatographie abgetrennt (Kieselgel 60, Gradienteneluent von Petrolether-Ethylacetat 7:3 zu reinem Ethylacetat). Die vereinigten organischen Phasen werden eingeeengt und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Man erhält 60 mg (10 % vom Rohproduktgemisch) farblose Einkristalle.

Schmelzpunkt 197.3 °C; IR (KBr): 3369 cm⁻¹ (NH), 1697 und 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.69-2.72 (m, 2H, CH₂), 2.95-2.98 (m, 2H, CH₂), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 7.67 (s, 1H, H arom.), 9.37 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 60.7 (CH₃), 29.2, 39.3 (CH₂), 129.2 (tert. C), 121.9, 123.5, 128.2, 135.6, 155.4, 172.4, 198.5 (quart. C); MS (EI): m/z (%) = 273 [M⁺] (58), 218 (100); C₁₁H₉Cl₂NO₃ [274.11]; ber. C 48.20, H 3.31, N 5.11; gef. C: 48.43, H: 3.32, N: 4.70.

Röntgenstruktur von Verbindung **3f**

Tab. 7-1: Kristalldaten und Strukturfeinheiten:

Summenformel	$C_{11}H_9Cl_2NO_3$	
Molekulargewicht	274.09	
Temperatur	133(2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	Orthorhombic	
Raumgruppe	Pbca	
Gitterkonstanten	$a = 8.5752(8)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7.2447(6)$ Å	$\beta = 90^\circ$
	$c = 35.598(3)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$2211.5(3)$ Å ³	
Z	8	
Dichte (berechnet)	1.646 Mg/m ³	
Absorptionskoeffizient	0.581 mm ⁻¹	
F(000)	1120	
Kristallgröße	0.40 x 0.18 x 0.07 mm ³	
Theta θ -Bereich für die Datensammlung	1.14 to 30.51°	
Limitierende Indizes:	-12 ≤ h ≤ 12, -10 ≤ k ≤ 10, -50 ≤ l ≤ 50	
Zahl der Reflexe	24349	
Unabhängige Reflexe	3377 [R(int) = 0.0393]	
Vollständigkeit bis $\theta = 30.00^\circ$:	99.9 %	
Adsorptionskorrektur	Integration	
Max. und Min. Transmission	0.9480 and 0.8425	
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F ²	
Daten/ Einschränkungen/ Parameter	3377 / 0 / 159	
Goodness-of-fit on F ²	1.085	
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0377, wR2 = 0.0922	
R indices (all data)	R1 = 0.0471, wR2 = 0.0960	
Größte Differenzpeaks	0.453 and -0.272 e.Å ⁻³	

Tab. 7-2: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalen Tensors.

	x	y	z	U(eq)
Cl(1)	9738.1(5)	1586.3(6)	5825.7(1)	24.8(1)
Cl(2)	3504.1(4)	1222.5(6)	5701.1(1)	24.0(1)
O(1)	1367.8(13)	1986.2(18)	6857.9(3)	22.9(2)
O(2)	7467.7(14)	4147.1(18)	7068.9(3)	25.8(3)
O(3)	6713.4(14)	841.6(17)	5445.7(3)	24.2(3)
N(1)	3410.9(15)	2490.8(19)	6477.4(4)	17.1(3)
C(2)	2780.8(17)	1930(2)	6814.5(4)	15.8(3)
C(3)	3912.8(18)	1334(2)	7111.4(4)	17.4(3)
C(4)	5007.1(17)	2905(2)	7224.2(4)	17.3(3)
C(5A)	6299.3(17)	2622(2)	6559.2(4)	14.5(3)
C(5)	6328.0(18)	3297(2)	6959.2(4)	16.2(3)
C(6)	7764.6(17)	2401(2)	6392.6(4)	16.6(3)
C(7)	7904.9(18)	1858(2)	6021.1(4)	17.6(3)
C(8)	6588.7(18)	1505(2)	5802.8(4)	17.1(3)
C(9)	5133.5(17)	1705(2)	5971.5(4)	15.7(3)
C(9A)	4946.7(16)	2257(2)	6348.2(4)	14.7(3)
C(10)	6540(3)	2180(3)	5151.1(5)	38.6(5)

Tab. 7-3: Bindungslängen [\AA]

Cl(1)-C(7)	1.7302(15)	C(3)-C(4)	1.529(2)
Cl(2)-C(9)	1.7322(15)	C(4)-C(5)	1.501(2)
O(1)-C(2)	1.2221(18)	C(5A)-C(6)	1.399(2)
O(2)-C(5)	1.2192(19)	C(5A)-C(9A)	1.407(2)
O(3)-C(8)	1.3631(18)	C(5A)-C(5)	1.506(2)
O(3)-C(10)	1.436(2)	C(6)-C(7)	1.385(2)
N(1)-C(2)	1.3773(19)	C(7)-C(8)	1.394(2)
N(1)-C(9A)	1.4052(18)	C(8)-C(9)	1.392(2)
C(2)-C(3)	1.499(2)	C C(9)- (9A)	1.409(2)

Tab. 7-4: Bindungswinkel [°]

C(8)-O(3)-C(10)	115.77(13)	C(7)-C(6)-C(5A)	121.03(14)
C(2)-N(1)-C(9A)	128.12(13)	C(6)-C(7)-C(8)	120.94(14)
O(1)-C(2)-N(1)	119.30(14)	C(6)-C(7)-Cl(1)	119.68(12)
O(1)-C(2)-C(3)	124.23(14)	C(8)-C(7)-Cl(1)	119.37(11)
N(1)-C(2)-C(3)	116.45(13)	O(3)-C(8)-C(9)	120.61(14)
C(2)-C(3)-C(4)	111.61(12)	O(3)-C(8)-C(7)	121.41(13)
C(5)-C(4)-C(3)	116.06(13)	C(9)-C(8)-C(7)	117.77(13)
C(6)-C(5A)-C(9A)	119.52(13)	C(8)-C(9)-C(9A)	122.83(13)
C(6)-C(5A)-C(5)	115.05(13)	C(8)-C(9)-Cl(2)	117.54(11)
C(9A)-C(5A)-C(5)	125.41(13)	C(9A)-C(9)-Cl(2)	119.64(11)
O(2)-C(5)-C(4)	119.95(13)	N(1)-C(9A)-C(5A)	125.12(13)
O(2)-C(5)-C(5A)	118.69(14)	N(1)-C(9A)-C(9)	116.90(13)
C(4)-C(5)-C(5A)	121.34(13)	C(5A)-C(9A)-C(9)	117.90(13)

Tab. 7-5: Torsionswinkel [°]

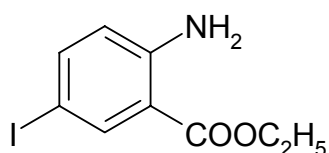
C(9A)-N(1)-C(2)-O(1)	-168.57(15)	Cl(1)-C(7)-C(8)-O(3)	4.1(2)
C(9A)-N(1)-C(2)-C(3)	13.2(2)	C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-0.4(2)
O(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-116.54(17)	Cl(1)-C(7)-C(8)-C(9)	178.81(12)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	61.62(17)	O(3)-C(8)-C(9)-C(9A)	175.32(14)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-78.20(17)	C(7)-C(8)-C(9)-C(9A)	0.5(2)
C(3)-C(4)-C(5)-O(2)	-160.27(14)	O(3)-C(8)-C(9)-Cl(2)	-4.0(2)
C(3)-C(4)-C(5)-C(5A)	18.2(2)	C(7)-C(8)-C(9)-Cl(2)	-178.85(11)
C(6)-C(5A)-C(5)-O(2)	23.3(2)	C(2)-N(1)-C(9A)-C(5A)	-46.7(2)
C(9A)-C(5A)-C(5)-O(2)	-155.10(15)	C(2)-N(1)-C(9A)-C(9)	136.75(16)
C(6)-C(5A)-C(5)-C(4)	-155.20(14)	C(6)-C(5A)-C(9A)-N(1)	-177.48(14)
C(9A)-C(5A)-C(5)-C(4)	26.4(2)	C(5)-C(5A)-C(9A)-N(1)	0.9(2)
C(9A)-C(5A)-C(6)-C(7)	1.1(2)	C(6)-C(5A)-C(9A)-C(9)	-1.0(2)
C(5)-C(5A)-C(6)-C(7)	-177.42(13)	C(5)-C(5A)-C(9A)-C(9)	177.40(14)
C(5A)-C(6)-C(7)-C(8)	-0.4(2)	C(8)-C(9)-C(9A)-N(1)	176.97(14)
C(5A)-C(6)-C(7)-Cl(1)	-179.61(12)	Cl(2)-C(9)-C(9A)-N(1)	-3.67(19)
C(10)-O(3)-C(8)-C(9)	84.9(2)	C(8)-C(9)-C(9A)-C(5A)	0.2(2)
C(10)-O(3)-C(8)-C(7)	-100.53(19)	Cl(2)-C(9)-C(9A)-C(5A)	179.51(11)
C(6)-C(7)-C(8)-O(3)	-175.15(14)		

Tab. 7-6: Wasserstoffbrückenbindungen: Bindungslängen [Å] und Winkel [°]

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(1)-H(01)...Cl(2)	0.80(2)	2.53(2)	2.9132(13)	110.8(18)
C(3)-H(3A)...O(1)#1	0.99	2.57	3.285(2)	128.7
C(4)-H(4A)...O(1)#2	0.99	2.63	3.440(2)	139.1
C(4)-H(4B)...O(1)#3	0.99	2.55	3.5330(19)	174.7
C(6)-H(6)...O(1)#4	0.95	2.62	3.5188(19)	158.8
C(3)-H(3B)...O(2)#5	0.99	2.57	3.5249(19)	162.6
C(10)-H(10C)...O(3)#6	0.98	2.49	3.222(2)	131.0

Tab. 7-7: Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

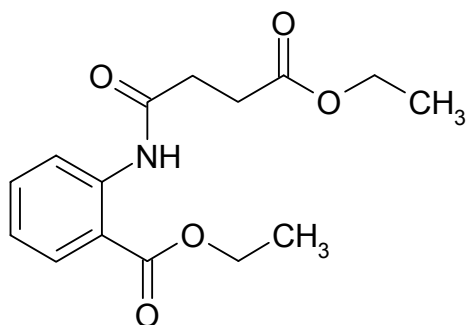
#1 -x+1/2,y-1/2,z	#3 x+1/2,y,-z+3/2	#5 -x+1,y-1/2,-z+3/2
#2 -x+1/2,y+1/2,z	#4 x+1,y,z	#6 -x+3/2,y+1/2,z

Ethyl 2-amino-5-iodbenzoat (4b)

6.55 g (25 mmol) 2-Amino-5-iodbenzoesäure (**8**) werden in 40 ml DMF mit 6.9 g (50 mmol) Kaliumcarbonat suspendiert und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. 4.29 g (27.5 mmol) Iodethan (**9**) werden in 10 ml DMF gelöst und langsam zu der Suspension hinzugegeben. Anschließend wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird auf 200 ml Eiswasser geschüttet, der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Aus Petrolether umkristallisieren. Man erhält 4.33 g (60%) farblose Kristalle.

Schmp.: 69 °C (Lit.²⁹: 68-70°C).

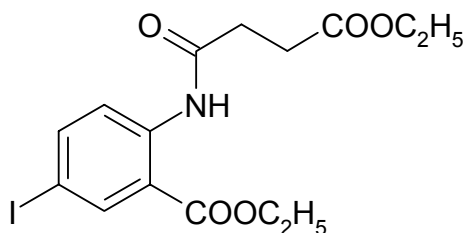
2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (6a)



Nach AAV 1 aus 29.7 g (180 mmol) Anthranilsäureethylester (**4a**) und 36.0 g (218 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**5**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 47.1 g (89%) farbloser Kristalle.

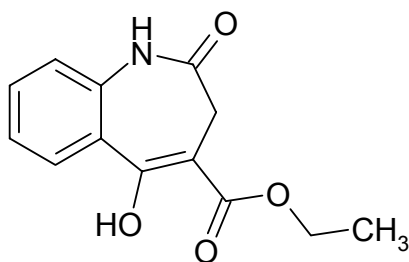
Schmp.: 60 °C (Lit.¹⁴⁵: 60 °C).

2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-5-iodbenzoesäureethylester (6b)

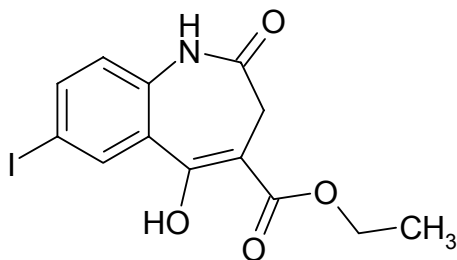


Nach AAV 1: Aus 5.40 g (18.6 mmol) Ethyl 2-amino-5-iodbenzoat (**4b**) und 36.1 g (22.5 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**5**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 6.90 g (89%) farblose Kristalle;

Schmp.: 100.0 °C (Lit.²⁹: 103-104°C).

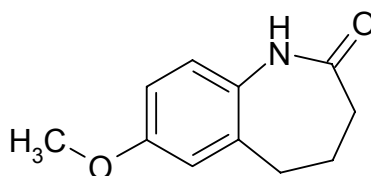
5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (7a)

Alle Arbeitsschritte bis einschließlich des Zutropfens von Wasser werden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt! 10.0 g (entspricht ca. 0.25 mol) des Bodensatzes einer Kaliumhydrid-Dispersion in Mineralöl (Achtung! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit! Gefahrstoff, siehe Anhang) werden unter Stickstoff dreimal mit je 50 ml Toluol gewaschen und dann in 75 ml Toluol suspendiert. Die Suspension wird mit einem Ölbad gekühlt. 14.7 g (50 mmol) 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-benzoesäureethylester (**6a**) werden in 20 ml DMF und 150 ml Toluol gelöst und über einem Tropftrichter in die gekühlte Suspension getropft. Nach beendeter Gasentwicklung wird etwa 2 h bei 70-80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden unter Kühlung im Eisbad zunächst vorsichtig 15 ml Eisessig und dann 150 ml Wasser zugetropft. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 9.9 g (80%) farblose Kristalle. Schmp.: 210-211 °C (Lit.²⁷: 210-213 °C).

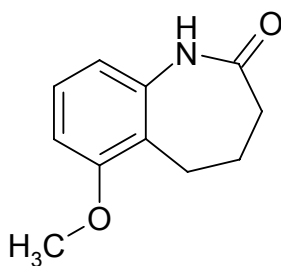
5-Hydroxy-7-iod-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (7b)

Alle Arbeitsschritte bis einschließlich des Zutropfens von Wasser werden unter Stickstoffatmosphäre (Einleiten von Stickstoff) durchgeführt! 2.0 g (entspricht ca. 50 mmol) des Bodensatzes einer Kaliumhydrid-Dispersion in Mineralöl (Achtung! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit! Gefahrstoff, siehe Anhang) werden dreimal mit je 10 ml Toluol gewaschen und dann in 10 ml Toluol suspendiert. Die Suspension wird mit einem Ölbad gekühlt. 4.19 g (10.0 mmol) 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-5-iod-benzoesäureethylester (**6b**) werden in 5 ml DMF und 40 ml Toluol gelöst und über einen Tropftrichter in die gekühlte Suspension getropft. Nach beendeter Gasentwicklung wird etwa 2 h bei 70-80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden zunächst vorsichtig 15 ml Eisessig und dann 150 ml Wasser zugetropft, anschließend wird im Eisbad gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petroläther gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 2.91 g (78%) farblose Kristalle. Schmp.: 210-211 °C (Lit.¹⁴⁴: 210-213 °C).

7-Methoxy-1,3,4,5-tetrahydro-2H-[1]benzazepin-2-on (**10a**)

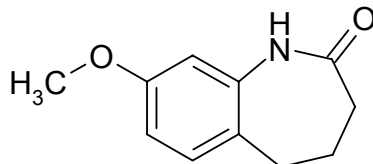


Nach AAV 2 aus 881 mg (5 mmol) 6-Methoxy-1-tetralon (**11a**) und 638 mg Natriumazid. Mittels Säulenchromatographie wird **10a** aus dem Produktgemisch von **14a** abgetrennt (Kieselgel 60, Gradienteneluent von Petrolether-Ethylacetat 7:3 zu reinem Ethylacetat). Die separierten Phasen werden vereinigt, im Vakuum eingengt und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Man erhält 133 mg (13 %) farblose Kristalle. Schmp.: 140 °C (Lit.³²: 140-141 °C)

6-Methoxy-1,3,4,5-tetrahydro-2H-[1]benzazepin-2-on (10b)

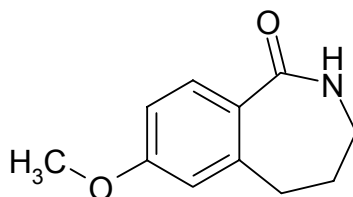
Nach AAV 2 aus 881 mg (5 mmol) 5-Methoxy-1-tetralon (**11b**) und 638 mg Natriumazid. Nach Umkristallisieren aus Methanol erhält man 557 mg (57 %) grün-braune Kristalle.

Schmp.: 159.6 °C (Lit.³⁶: 162 °C)

8-Methoxy-1,3,4,5-tetrahydro-2H-[1]benzazepin-2-on (10c)

Nach AAV 2 aus 4400 mg (25 mmol) 7-Methoxy-1-tetralon (**11c**). Nach Umkristallisieren aus Aceton erhält man 2.25 g (45 %) braune Kristalle.

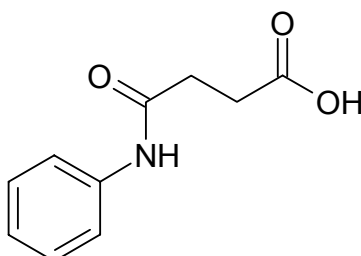
Schmp.: 128.6 °C (Lit.³²: 132-134 °C)

7-Methoxy-2,3,4,5-tetrahydro-1H[2]benzazepin-1-on (14a)

Nach AAV 2 aus 881 mg (5 mmol) 6-Methoxy-1-tetralon (**11a**) und 638 mg Natriumazid. Mittels Säulenchromatographie wird **14a** aus dem Produktgemisch von **10a** abgetrennt (Kieselgel 60, Gradienteneluent von Petrolether-Ethylacetat 7:3 zu reinem Ethylacetat). Die separierten Phasen werden vereinigt, im Vakuum eingengt und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Man erhält 133 mg (13 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 140 °C (Lit.³²: 140-141 °C)

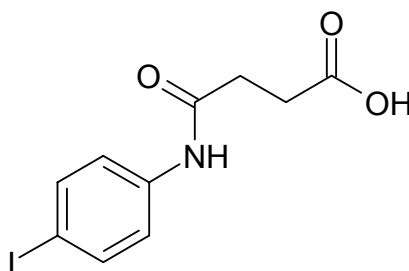
4-Anilin-4-oxo-butancarbonsäure (**15a**)



Zu einer gerührten Lösung aus 100 mg (10.0 mmol) Bernsteinsäureanhydrid (**5**) in 10 ml THF wird langsam 931 mg (10.0 mmol) frisch destilliertes Anilin (**16a**) in 10 ml THF zugetropft. Der Ansatz wird für weitere 3h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum eingengt. Man erhält 1.73 g (89 %) Rohprodukt, welches ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt wird.

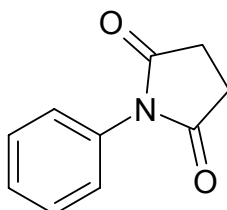
Schmp.: 142 °C (Lit.¹⁴⁶: 149 °C)

4-[(4-Iodphenyl)amino]-4-oxo-butancarbonsäure (**15b**)



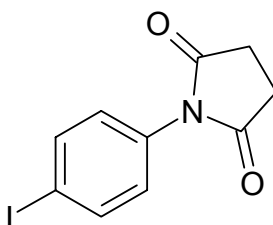
Zu einer gerührten Lösung aus 100 mg (10.0 mmol) Bernsteinsäureanhydrid (**5**) in 10 ml THF wird langsam eine Lösung von 2.19 g (10.0 mmol) 4-Iodanillin (**16b**) in 10 ml THF zugetropft. Der Ansatz wird für weitere 3h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum eingeeengt. Man erhält 2.69 g (84 %) Rohprodukt, welches ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt wird.
Schmp.: 206 °C (Lit.¹⁴⁷: 215 °C)

1-Phenylpyrrolidin-2,5-dion (**18a**)



Nach AAV 2 aus 483 mg (2,5 mmol) 4-Anilin-4-oxo-butancarbonsäure (**15a**), 3.78 g Polyphosphorsäure (hergestellt aus 2.5 g Phosphorpentoxid und 0.75 ml Phosphorsäure) und 5 ml Eisessig. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 83 mg (19 %) farblose Kristalle.
Schmp.: 153 °C (Lit.¹⁴⁸: 153-155 °C)

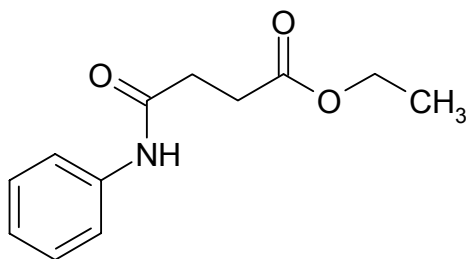
1-(4-Iodphenyl)-pyrrolidin-2,5-dion (**18b**)



Nach AAV 2 aus 193 mg (1 mmol) 4-[(4-Iodphenyl)amino]-4-oxo-butancarbonsäure (**15b**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 156 mg (52 %) farblose Kristalle.

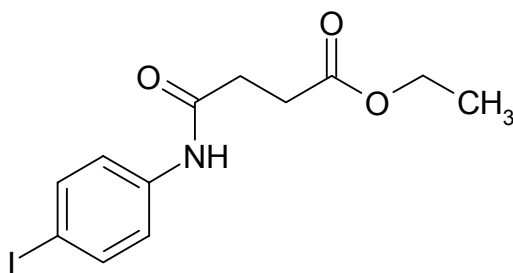
Schmp.: 211 °C (Lit: nach Sanna¹⁴⁹: 239 °C, Beringer¹⁴⁷: 84 °C); IR (KBr): 3085 cm^{-1} (CH arom.), 2928 cm^{-1} (CH aliph.), 1699 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.77(s, 4H, CH₂CH₂), 7.09 ("d", 2H, J = 8.6 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems), 7.85 ("d", 2H, J = 8.6 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 28.5 (2x) (sec. C.), 129.1 (2x), 137.6 (2x) (tert. C), 94.0, 132.4, 176.6 (2x) (quart. C); C₁₀H₈INO₂ [301.09].

4-Anilin-4-oxo-butancarbonsäureethylester (21a)



Nach AAV 1 aus 1.40 g (15 mmol) Anilin (**16a**) und 2.98 g (18.1 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**5**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 1.45 g (44 %) farblose Kristalle.

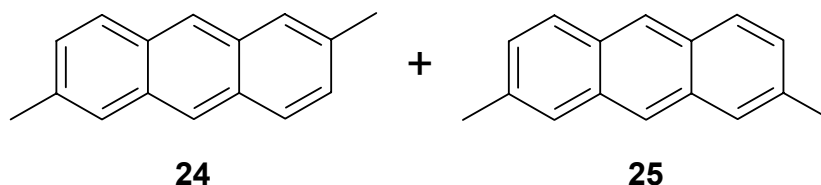
Schmp.: 65 °C (Lit.¹⁵⁰: 65 °C)

4-(4-Iodanilin)-4-oxo-butancarbonsäureethylester (21b)

Nach AAV 1 aus 3.29 g (15 mmol) Iodanilin (**16b**) und 2.98 g (18.1 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**5**). Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

Farblose Kristalle; Ausbeute: 3.21 g (62 %); Schmp.: 112 °C; IR (KBr): 3345 cm⁻¹ (NH), 2973 cm⁻¹ (CH aliph), 1686 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.17 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃), 2.58-2.60 (m, 4H, CH₂CH₂), 4.05 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 7.41-7.43 (m, 2H, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.60-7.62 (m, 2H, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 10.08 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 14.0 (CH₃), 28.6, 30.9, 59.8 (sec. C.), 121.1 (2x), 137.3 (2x) (tert. C), 86.2, 139.0, 170.0, 172.2 (quart. C); C₁₂H₁₄INO₃ [347.15]; ber. C 41.52, H 4.06, N 4.03; gef. C 41.50, H 4.00, N 4.02.

Produktgemisch aus den Verbindungen 2,6-Dimethyl-anthracen (**24**) und 2,7-Dimethyl-anthracen (**25**)

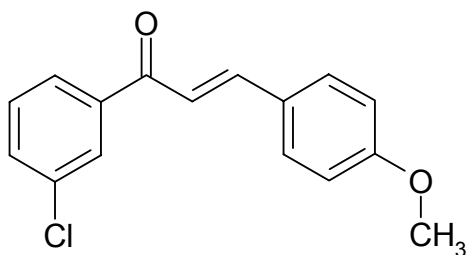


2 ml Dichlormethan werden mit 500 mg (3.75 mmol) wasserfreiem Aluminiumchlorid gerührt und unter Eiskühlung 2 ml Toluol hinzuge tropft.

Anschließend wird über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

Grüne, nadelförmige Kristalle, 95.6 mg; Schmp.: 214 °C; IR (KBr): 2910 cm^{-1} (CH aliph.), 1631 (C=CH, arom) cm^{-1} , 892 cm^{-1} (C=CH, arom); $^1\text{H-NMR}$: Das Spektrum stellt ein Gemisch der Verbindungen **24** und **25** im Verhältnis 0.68 zu 1 dar. $^1\text{H-NMR}$ -Lit.-Daten für 2,6-Dimethyl-anthracen (**24**): Wang⁴⁶ für 2,7-Dimethyl-anthracen (**25**): House⁴⁵ ([D6]- CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.53 („s“, 8.62 H, CH_3 , überlagerte Signale von **24** und **25**), 7.24-7.29 (m, 2.83 H, arom. H.), 7.71 („s“, 3.05 H, arom. H, überlagerte Signale von **24** und **25**), 7.87 („d“, 2.83 H, J = 8.6 Hz, arom. H, überlagerte Signale von **24** und **25**), 8.19 (s, 1.08 H, arom H von Verbindung **25**), 8.25 (s, 0.73 H, arom H von Verbindung **24**), 8.31 (s, 1.05 H, arom H von Verbindung **25**); MS (EI): m/z (%) = 206 $[\text{M}]^+$ (100), 191 (26), 189 (24), 205 (22); HPLC: 97.4 % bei 254 nm und 98.8 % bei 280 nm, Substanzgemisch erscheint als ein Peak bei t_s = 6.780 min, t_m = 1,100 min (ACN/ H_2O 80:20), Lambda max: 255 nm; $\text{C}_{16}\text{H}_{14}$ [206.29].

(2E)-1-(3-Chlorphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-on (**28a**)

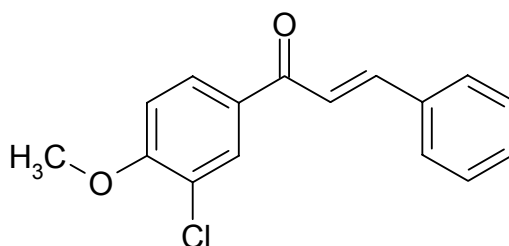


Nach AAV 4 aus 3.87 g (25 mmol) 3-Chloracetophenon und 3.40 g (25 mmol) frisch destilliertem 4-Methoxybenzaldehyd.

Gelbe Kristalle, Ausbeute: 4.45 g (65 %); Schmp.: 93.5 °C; IR (KBr): 3066 cm^{-1} (CH arom.), 2845 cm^{-1} (CH aliph.), 1663 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400

MHz): δ (ppm) = 3.56 (s, 3H, CH₃), 7.01-7.05 ("d", 2H, J = 8.9 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems), 7.60 (t, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H), 7.71-7.77 (m, 2H, arom. H und H an der Doppelbindung), 7.82 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H der Doppelbindung), 7.89 ("d", 2H, J = 8.9 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems), 8.10 ("dt", 1H, J = 7.9/1.2/1.1 Hz, arom. H), 8.17 (t, 1H, J = 1.8 Hz, arom. H); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.3 (CH₃), 114.3 (2x), 119.0, 126.9, 127.9, 130.6, 131.0 (2x), 132.5, 144.8 (tert. C), 127.1, 133.7, 139.6, 161.5, 187.6 (quart. C); C₁₆H₁₃ClO₂ [272.73]; Die Verbindung wurde in der Literatur ohne Angabe von analytischen Daten publiziert.¹⁵¹

(2E)-1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-prop-2-en-1-on (28b)

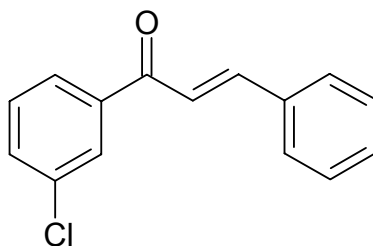


Nach AAV 4 aus 4.61 g (25 mmol) 3-Chlor-4-methoxy-acetophenon und 2.65 g (25 mmol) frisch destilliertem Benzaldehyd.

Gelbe Kristalle, Ausbeute: 5.45 g (80 %); Schmp.: 137.5 °C; IR (KBr): 3013 cm⁻¹ (CH arom.), 2847 cm⁻¹ (CH aliph.), 1657 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 4.00 (s, 3H, CH₃), 7.32 (d, 1H, J = 8.6 Hz, arom. H), 7.45-7.49 (m, 3H, arom. H), 7.75 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H der Doppelbindung), 7.90-7.93 (m, 2H, arom. H), 7.98 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H der Doppelbindung), 8.20 (dd, 1H, J = 8.6/2.3 Hz, arom. H), 8.26 (d, 1H, J = 2.3 Hz, arom. H); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 57.3 (CH₃), 113.0, 122.0, 127.3, 129.0, 129.2, 129.4, 130.0, 130.6, 131.0, 144.3 (tert. C), 131.4, 135.1, 158.7, 187.9 (quart. C, ein Signal fehlt aufgrund von Überlagerung); C₁₆H₁₃ClO₂ [272.73]; ber. C 70.46 H

4.80; gef. C 70.52 H 4.86; Die Verbindung wurde in der Literatur ohne Angabe von analytischen Daten publiziert.¹⁵²

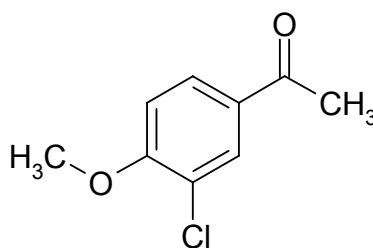
(2E)-1-(3-Chlor-phenyl)-3-phenyl-prop-2-en-1-on (28c)



Nach AAV 4: Aus 2.31 g (15.0 mmol) 3-Chloracetophenon und 1.59 g (15.0 mmol) Benzaldehyd. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 2.53 g (62 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 94.7°C (Lit.¹⁵³: 93-94 °C)

1-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-ethanon (29b)

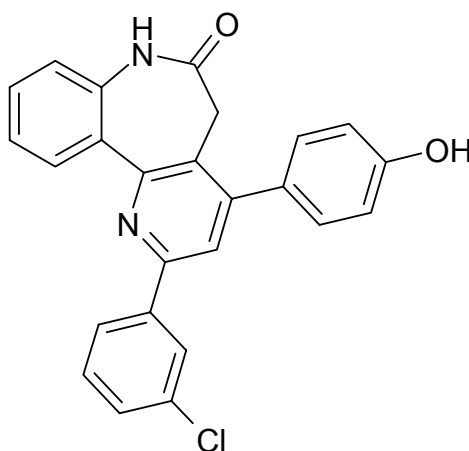


Zu einer eisgekühlten Suspension von 1426 mg (10.0 mmol) o-Chloranisol und 4.00 g (30.0 mmol) wasserfreiem Aluminium(III)chlorid in 20 ml Dichlormethan werden portionsweise 2.36 g (30.0 mmol) Acetylchlorid hinzugegeben. Unter Kühlung wird der Ansatz für 1 h weiter gerührt, anschließend auf 20 ml Eiswasser gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird aus Ethylacetat umkristallisiert. Man erhält 4.62 g (83 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 76°C (Lit.¹⁵⁴: 74-76 °C)

2-(3-Chlorphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (32a)

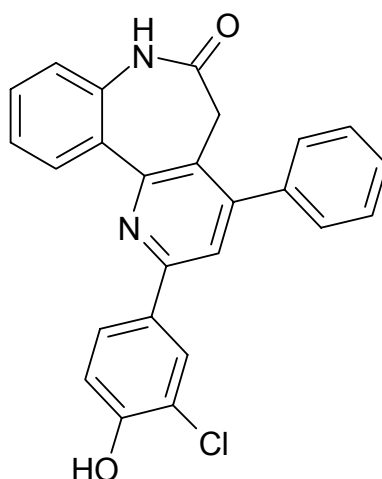


Nach AAV 5 aus 427 mg (1 mmol) des 2-(3-Chlorphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-ons (**35a**) mit 1002 mg (4 mmol) Bortribromid. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

Farbloses Pulver, Ausbeute 250 mg (61%); Schmp.: 285-286 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3246 cm⁻¹ (OH), 1665 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34-3.76 (b, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 6.97 ("d", 2H, *J* = 8.4 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems), 7.25 ("d", 1H, *J* = 8.1 Hz, arom. H), 7.37 ("dt", 1H, *J* = 8.1/7.9/1.0 Hz, arom. H), 7.50-7.56 (m, 5H, arom. H), 7.98 (s, 1H, arom. H), 8.18-8.22 (m, 2H, arom. H), 8.29 ("t", 1H, *J* = 1.8 Hz, arom. H), 9.80 (s, 1H, OH), 10.40 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.4 (Azepin-CH₂), 115.2, 120.5, 121.4, 123.8, 125.4, 126.4, 128.8, 129.8, 130.5, 131.0, 131.1 (tert. C), 126.1, 128.0, 130.9, 133.6, 137.4, 140.5, 149.5, 152.7, 154.2, 157.8, 171.3 (quart. C); HPLC: 99.9 % bei 254 nm, *t*_s=

5.686 min, $t_m = 1,027$ min (ACN/H₂O 60:40), Lambda max: 249 nm; C₂₅H₁₇ClN₂O₂ [412.88]; ber. C 72.73, H 4.15, N 6.78, gef. C 72.47, H 4.33, N 6.57.

2-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (32b)

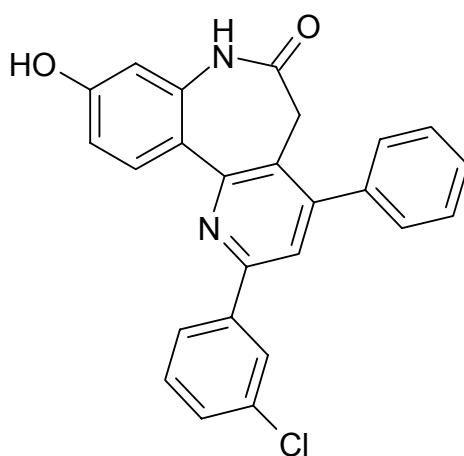


Nach AAV 5 aus 292 mg (0.69 mmol) 2-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**35b**) mit 596 mg (2.76 mmol) Bortribromid. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

Farbloses Pulver, Ausbeute 148 mg (52%); Schmp.: 308.4 °C; IR (KBr): 3267 cm⁻¹ (OH), 3067 cm⁻¹ (CH, arom.), 1668 (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34-4.00 (b, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 7.08 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, arom. H), 7.24 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, arom. H), 7.37 ("dt", 1H, $J = 8.1/7.9/0.9$ Hz, arom. H), 7.51-7.61 (m, 4H, arom. H), 7.65-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.91 (s, 1H, arom. H), 8.06 (dd, 1H, $J = 8.4/2.3$ Hz, arom. H), 8.17 (dd, 1H, $J = 7.6/1.3$ Hz, arom. H), 8.25 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, arom. H), 10.39 (s, 1H, NH), 10.40-10.70 (b, 1H, OH, überlappend mit NH-Signal); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.3 (Azepin-CH₂), 116.6, 119.4, 121.4, 123.8, 126.6, 128.1, 128.3, 128.4 (2x), 129.6 (2x), 129.8, 131.0 (tert. C), 120.2, 124.9, 130.9, 137.3, 137.6, 149.2, 153.2, 153.9, 171.2 (quart. C, zwei Signale fehlen)

aufgrund von Überlagerungen); HPLC: 98.5 % bei 254 nm, t_s = 3.577 min, t_m = 1.036 min (ACN/H₂O 60:40), λ_{max} : 254 nm; C₂₅H₁₇ClN₂O₂ [412.88]; ber. C 72.73, H 4.15, N 6.78; gef. C 71.55, H 4.10, N 6.22; HRMS-EI (m/z): ber. 412.0978, gef. 412.0969.

2-(3-Chlorphenyl)-9-hydroxy-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (32c)

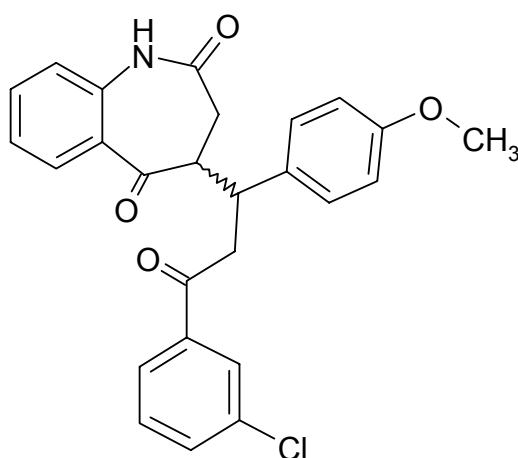


Nach AAV 5 aus 250 mg (0.58 mmol) 2-(3-Chlorphenyl)-9-methoxy-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**35c**) und 501 mg (2.32 mmol) Bortribromid. Die Umkristallisation erfolgt aus Toluol.

Graue Kristalle, Ausbeute 124 mg (52%); Schmp.: 287.8 °C; IR (KBr): 3272 cm⁻¹ (OH), 3061 cm⁻¹ (CH, arom.), 1684 (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.20-3.50 (b, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 6.66 (d, 1H, J = 2.3 Hz, arom. H), 6.82 (dd, 1H, J = 8.6/2.3 Hz, arom. H), 7.52-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.67 (m, 2H, arom. H), 7.95 (s, 1H, Pyrido-H), 8.04 (d, 1H, J = 8.8 Hz, arom. H), 8.21 (d, 1H, J = 7.1 Hz, arom. H), 8.29 (s, 1H, arom. H), 10.01 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, OH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.7 (Azepin-CH₂), 107.1, 112.3, 119.9, 125.5, 126.5, 128.4, 128.5 (2x), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 132.5 (tert. C), 122.1, 125.1, 133.7, 137.7, 138.8,

140.4, 149.5, 152.7, 154.5, 159.0, 170.8 (quart. C); HPLC: 97.78 %, t_s = 2.800 min, t_m = 1.053 min, Acetonitril/Wasser (70/30); $C_{25}H_{17}ClN_2O_2$ [412.88] ber. C 72.73, H 4.15, N 6.78, gef. C 70.89, H 4.28, N 6.30; HRMS-El (m/z): ber. 412.0978, gef. 412.0975.

(±) 4-[3-(3-Chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-propyl]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (33a)

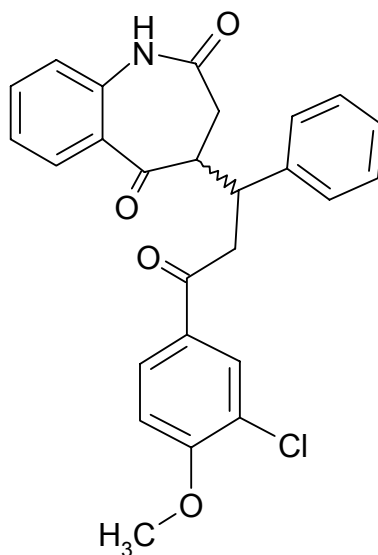


Nach AAV 6a aus 350 mg (2 mmol) 3,4-Dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**3a**), 545 mg (2 mmol) (2E)-1-(3-Chlorphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-on (**28a**) und 8 mg Lithiumhydroxid.

Farbloses, amorphes Pulver. Ausbeute 583 mg (65 %); Schmp.: 197.7 °C; IR (KBr): 3222 cm^{-1} (NH), 3070 cm^{-1} (CH, arom.), 1668 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.62 (m, 1H, J = 14.4 Hz, aliph. H), 2.95 (dd, 1H, J = 14.7/11.5 Hz, aliph. H), 3.11 (ddd, 1H, J = 11.4/5.1/1.4 Hz, aliph. H), 3.21 (dd, 1H, J = 17.8/3.9 Hz, aliph. H), 3.69 (s, 3H, CH_3), 3.72-3.81 (m, 1H, aliph. H), 4.01-4.06 (m, 1H, aliph. H), 6.77-6.82 (m, 2H, arom. H des AA'XX'-Systems), 7.12-7.18 (m, 4H, arom. H), 7.50-7.56 (m, 2H, arom. H), 7.69 (ddd, 1H, J = 8.0/2.0/0.8 Hz, arom. H), 7.73 (dd, 1H, J = 8.1/1.2 Hz, arom. H), 7.90 ("dt", 1H, J = 7.9/1.3/1.1 Hz, arom. H), 7.98 (t, 1H, J = 1.75 Hz, arom. H), 10.18 (s, 1H,

NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 54.8 (CH_3), 31.9 (CH_2), 40.1 (CH), 53.0 (CH), 113.5, 121.2, 123.3, 126.4, 127.6, 128.9, 130.5, 130.6, 132.8, 133.8 (tert. C), 127.2, 133.1, 133.6, 138.3, 138.4, 157.7, 172.3, 197.1, 199.84 (quart. C), Signal der azepinischen CH_2 -Gruppe fehlt; $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$ [447.92]; ber. C 69.72, H 4.95, N 3.13; gef. C 69.93, H 5.02, N 2.98.

(±) 4-[3-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-oxo-propyl]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (33b)

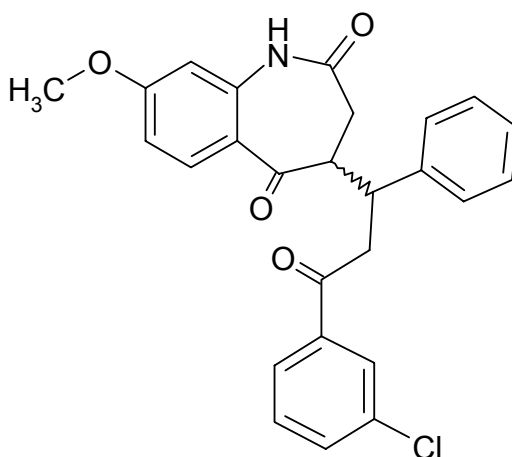


Nach AAV 6b aus 788 mg (4,5 mmol) 3,4-Dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**3a**), 1226 mg (4,5 mmol) des (2E)-1-(3-Chlorphenyl-4-methoxy)-3-phenyl-prop-2-en-1-on (**28b**) und 25 mg Kaliumhydroxid.

Weißes amorphes Pulver, Ausbeute 1.232 mg (61 %); Schmp.: 189.5 °C; IR (KBr): 3221 cm^{-1} (NH), 3086 cm^{-1} (CH, arom.), 1663 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.60 ("d", 1H, J = 14.5 Hz, aliph. H), 2.98 (dd, 1H, J = 14.5/11.7 Hz, aliph. H), 3.10-3.18 (m, 2H, aliph. H), 3.74-3.81 (m, 1H, aliph. H), 3.94 (s, 3H, CH_3), 4.08-4.13 (m, 1H, aliph. H), 7.14-7.17 (m, 3H, arom. H), 7.23-7.26 (m, 5H, arom. H), 7.52 ("dt", 1H, J = 7.9/7.6/1.53 Hz, arom. H), 7.73 ("d", 1H, J = 7.9 Hz, arom. H), 7.95 (dd, 1H, J = 8.6/2.0 Hz, arom. H), 8.03 (d,

1H, $J = 2.03$ Hz, arom. H), 10.20 (s, 1H, NH); die ^{13}C -NMR-Daten zeigen einen doppelten Signalsatz des Diastereomeren-Gemisches; $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$ [447.92]; ber. C 69.72 H 4.92 N 3.13; gef. C 69.45 H 5.02 N 3.26.

(±) 4-[3-(3-Chlorphenyl)-3-oxo-1-phenylpropyl]-8-methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (33c)

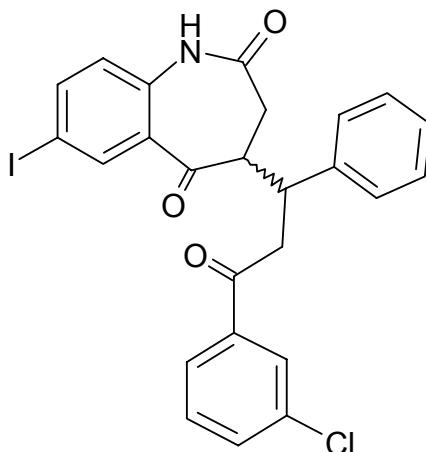


Nach AAV 6a aus 205 mg (1 mmol) 8-Methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**3c**), 243 mg (1 mmol) (2E)-1-(3-Chlorphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-on (**28c**) und 2.6 mg Lithiumhydroxid.

Gelbes Pulver, Ausbeute 281 mg (62 %); Schmp.: 201.8 °C; IR (KBr): 1681 cm^{-1} (C=O), 1658 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.32 (dd, 1H, $J = 14.9/10.9$ Hz, aliph. H), 2.95 (d, 1H, $J = 14.7$ Hz, aliph. H), 3.21 ("t", 1H, $J = 9.9$ Hz, aliph. H), 3.51-3.64 (m, 2H, aliph. H), 3.78 (s, 3H, CH_3), 3.96 (dd, 1H, $J = 13.9/7.8$ Hz aliph. H), 6.68 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, arom. H), 6.72 (dd, 1H, $J = 8.9/2.5$ Hz, arom. H), 7.15-7.30 (m, 5H, arom. H), 7.52 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, arom. H), 7.66-7.71 (m, 2H, arom. H), 7.84 (d, 1H, $J = 7.58$ Hz, arom. H), 7.91 (s, 1H, arom. H), 10.12 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.5 (CH_3), 40.6, 50.1 (CH_2), 32.9, 42.6 (CH), 104.9, 109.9, 126.4, 126.6, 127.6, 128.1 (2x), 128.6 (2x), 130.6, 132.7, 132.8 (tert. C),

120.0, 133.6, 138.5, 140.6, 140.8, 163.4, 172.0, 197.1, 198.7 (quart. C); $C_{26}H_{22}ClNO_4$ [447.92]; ber. C 69.72 H 4.92 N 3.13; gef. C 69.68, H 5.01, N 3.16.

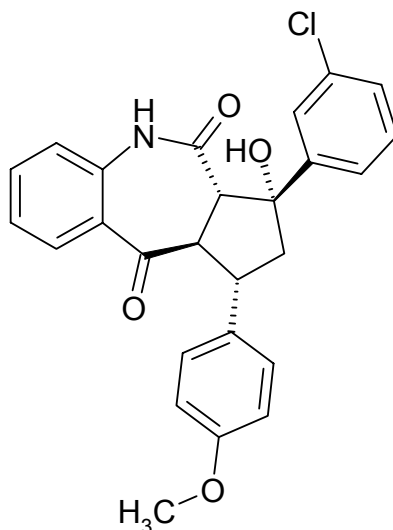
(±) 4-[3-(3-Chlorphenyl)-3-oxo-1-phenylpropyl]-7-iod-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (33d)



Nach AAV 6b aus 602 mg (2 mmol) 7-Iod-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**3c**), 485 mg (2 mmol) (2E)-1-(3-Chlorphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-on (**28c**) und 11 mg Kaliumhydroxid.

Gelbes Pulver, Ausbeute 1014 mg (93 %); Schmp.: 209.7 °C; IR (KBr): 3060 cm^{-1} (CH, arom.), 1663 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.62 ("d", 1H, J = 14.4 Hz, aliph. H), 2.99 (dd, 1H, J = 14.4/11.9 Hz, aliph. H), 3.19 (dd, 1H, J = 10.9/4.0 Hz, aliph. H), 3.25 (dd, 1H, J = 18.2/3.5 Hz, aliph. H), 3.81 (dd, 1H, J = 17.9/10.4 Hz aliph. H), 4.09-4.14 (m, 1H, aliph. H), 6.98 (d, 1H, J = 8.6 Hz, arom. H), 7.23-7.30 (m, 5H, arom. H), 7.55 (t, 1H, J = 7.8, arom. H), 7.70 (d, 1H, J = 7.8, arom. H), 7.86 (dd, 1H, J = 8.6, arom. H), 7.90 (d, 1H, J = 7.8, arom. H), 7.99-8.00 (m, 2H, arom. H), 10.28 (s, 1H, NH); die ^{13}C -NMR-Daten zeigen einen doppelten Signalsatz eines Diastereomeren-Gemisches; $C_{25}H_{19}ClINO_3$ [543.78]; ber. C 55.22 H 3.52 N 2.28; gef. C 56.46 H 3.66 N 2.28.

(±)-(1*SR*,3*RS*,3a*SR*,10a*RS*)-3-(3-Chlorphenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-2,3,3a,10a-tetrahydrobenzo-[*b*]cyclopenta[*e*][1]azepin-4,10(1*H*,5*H*)-dion (34a)



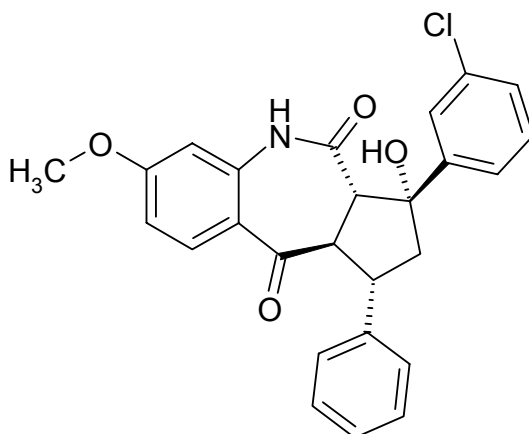
Nach AAV 6a aus 876 mg (5 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**3a**), 1364 mg (5 mmol) des (2*E*)-1-(3-Chlorphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-on (**28a**) und 8 mg Kaliumhydroxid. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

Weißes amorphes Pulver, Ausbeute 1345 mg (60 %); Schmp.: 236.2 °C; IR (KBr): 3510 cm⁻¹ (NH), 3186 cm⁻¹ (CH, arom.), 1652 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.00 (dd, 1H, *J* = 14.0/3.3 Hz, aliph.H), 2.45-2.50 (m, 1H, überlappend mit DMSO-Signal, aliph. H), 3.62 (dd, 1H, *J* = 13.0/7.4, aliph. H), 3.73 (s, 3H, CH₃), 3.89-3.94 (m, 1H, aliph.H), 4.00 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz, aliph.H), 5.73 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, OH), 6.86 („d“, 2H, *J* = 8.9 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems), 7.17 (dd, 1H, *J* = 8.1/0.8, arom. H), 7.24-7.28 (m, 2H, arom. H), 7.33 („t“, 1H, *J* = 7.9/7.6, arom. H), 7.52 („d“, 2H, arom. H des AA'XX'-Systems), 7.55-7.59 (m, 2H, arom. H), 7.70 (t, 1H, *J* = 1.8 Hz, arom. H), 7.98 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.5 Hz, arom. H), 10.44 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 60.6 (CH₃), 49.1 (CH₂), 44.7, 51.5, 60.6 (aliph. CH), 113.4 (2x), 122.0, 123.9, 125.3, 126.3, 129.1 (2x), 129.6, 130.5, 134.0 (tert. arom. C), 82.2 (R₃C-OH), 126.4, 132.7, 137.5, 138.5, 148.4, 157.4, 173.4, 198.9 (quart. C), ein Signal eines tertiären Kohlenstoffs fehlt aufgrund von

Überlagerung; HPLC: 99.8 % bei 250 nm und 100.0 % bei 280 nm, t_s = 5.713 min, t_m = 1.027 min, (ACN/H₂O 60:40); Lambda max: 228 nm. C₂₆H₂₂ClNO₄ [447,92]; ber. C 69.72, H 4.95, N 3.13; gef. C 69.76, H 4.97, N 2.82.

Die vorläufige Zuordnung der relativen Konfiguration erfolgt anhand der Ähnlichkeit der spektralen Daten mit einer Analogverbindung, deren relative Konfiguration aufgeklärt wurde.⁴⁸

(±)-(1*SR*,3*RS*,3a*SR*,10a*RS*)-3-(3-Chlorphenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-1-(4-phenyl)-2,3,3a,10a-tetrahydro-benzo-[*b*]-cyclopenta[*e*]azepin-4,10(1*H*,5*H*)-dion
(**34c**)



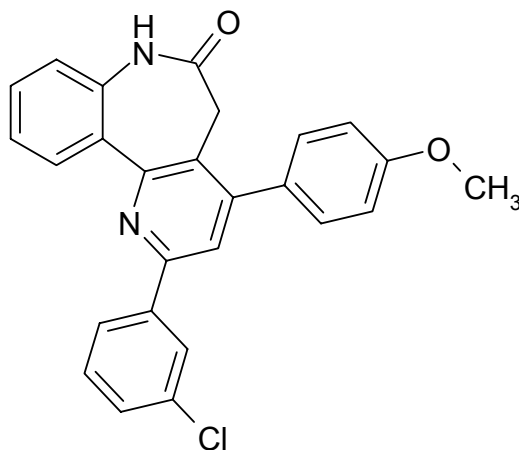
Nach AAV 6b aus 20.5 mg (0.1 mmol) 8-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**3c**) und 24.3 (0.1 mmol) des (2*E*)-1-(3-Chlorphenyl)-3-phenyl-prop-2-en-1-ons (**28c**) und 0.6 mg Kaliumhydroxid. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

Weißes amorphes Pulver, Ausbeute 22 mg (49 %); Schmp.: 268.7 °C; IR (KBr): 1651 cm⁻¹(C=O), 1269 cm⁻¹(Ether); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.04 (dd, 1H, *J* = 13.9/2.8 Hz, aliph. H), 2.46 (dd, 1H, *J* = 13.9/2.0 Hz, aliph. H, überlappend mit DMSO-Signal), 3.61 (dd, 1H, *J* = 12.9/7.3 Hz, aliph. H), 3.80 (s, 3H, O-CH₃), 3.99-4.03 (m, 2H, aliph. H), 5.67 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, HO), 6.72 (d,

1H, $J = 2.3$ Hz, arom. H), 6.85 (dd, 1H, $J = 8.9/2.5$ Hz, arom. H), 7.16 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz, arom. H), 7.26-7.36 (m, 4H, arom. H), 7.58-7.62 (m, 3H, arom. H), 7.72 (s, 1H, arom. H), 7.99 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, arom. H), 10.37 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 59.7 (CH_3), 48.7 (CH_2), 45.1, 51.8, 59.8 (aliph. CH), 105.9, 110.7, 124.0, 125.3, 125.6, 126.3, 128.0 (2x), 128.2 (2x), 129.6, 132.9 (tert. C), 84.2 ($\text{R}_3\text{C-OH}$) 119.4, 132.8, 139.6, 146.7, 148.5, 163.4, 173.4, 197.0 (quart. C); HPLC: 97.9 % bei 250 nm, $t_s = 2.937$ min, $t_m = 1.054$ min, (ACN/ H_2O 70:30); Lambda max: 228 nm $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$ [447,92]; ber. C 69.72, H 4.95, N 3.13; gef. C 69.36, H 4.86, N 2.89.

Die vorläufige Zuordnung der relativen Konfiguration erfolgt anhand der Ähnlichkeit der spektralen Daten mit einer Analogverbindung, deren relative Konfiguration aufgeklärt wurde.⁴⁸

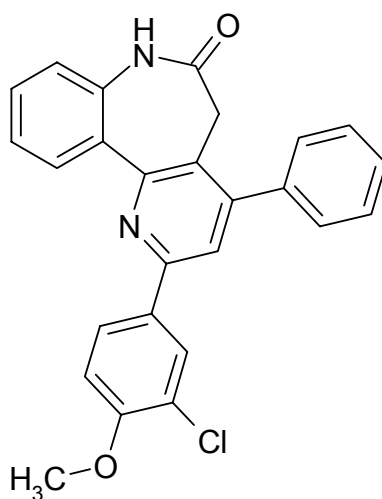
2-(3-Chlorphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (35a)



Nach AAV 7 aus 1.119 g (2.5 mmol) 4-[3-(3-Chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-propyl]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33a**), 2.5 g Ammonium-eisen(III)sulfat-Dodecahydrat und 3 g Ammoniumacetat.

Farbloses amorphes Pulver, Ausbeute 775 mg (73 %); Schmp.: 258.4 °C; IR (KBr): 3182 cm⁻¹ (NH), 3066 cm⁻¹ (CH, arom.), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34-3.76 (b, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 3.87 (s, 3H, CH₃), 7.13-7.18 ("d", 2H, J = 8.7 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems), 7.25 (dd, 1H, J = 7.9/0.8 Hz, arom. H), 7.38 ("dt", J = 7.9/7.9/1.1 Hz, 1H, arom. H), 7.51-7.58 (m, 3H, arom. H), 7.65 ("d", 2H, J = 8.7 Hz, arom. H des AA'XX'-Systems), 8.02 (s, 1H, arom. H), 8.18-8.24 (m, 2H, arom. H), 8.29-8.31 (t, 1H, J = 1.8 Hz, arom. H), 10.42 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.2 (CH₃), 35.4 (Azepin-CH₂), 113.9, 120.6, 121.5, 123.9, 125.4, 126.4, 128.7, 129.9, 130.5, 131.0, 131.1 (tert. C), 126.1, 130.9, 133.7, 135.4, 137.4, 140.5, 149.1, 152.8, 154.2, 159.5, 171.2 (quart. C); HPLC: 97.9 % bei 254 nm, t_s = 3.510 min, t_m = 1.103 min (ACN/H₂O 70:30), Lambda max: 265 nm; C₂₆H₁₉ClN₂O₂ [426.91]; HRMS-FAB (m/z): ber. [M + H]⁺ 427.1214, gef. [M + H]⁺ 427.1223.

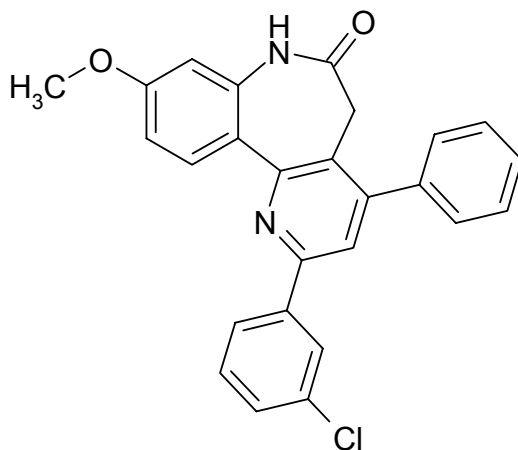
2-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (35b)



Nach AAV 7 aus 224 mg (0.5 mmol) 4-[3-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-oxo-propyl]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**33b**), 0.5 g Ammonium-eisen(III)sulfat-Dodecahydrat und 0.6 g Ammoniumacetat.

Grauweißes, amorphes Pulver, Ausbeute 118 mg (55 %); Schmp.: 268.8 °C; IR (KBr): 3080 cm^{-1} (CH, arom.), 2978 cm^{-1} (CH, aliph.), 1684 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34-3.76 (b, 2H, Azepin CH_2 , überlappend mit H_2O -Signal), 3.93 (s, 3H, CH_3), 7.24-7.28 (m, 2H, arom. H), 7.38 ("dt", 1H, J = 8.4/7.9/1.2 Hz, arom. H), 7.51-7.62 (m, 4H, arom. H), 7.65-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.98 (s, 1H, arom. H), 8.18 (dd, 1H, J = 7.9/1.5 Hz, arom. H), 8.2 (dd, 1H, J = 8.7/2.3 Hz, arom. H), 8.34 (d, 1H, J = 2.3 Hz, arom. H), 10.40 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.3 (Azepin- CH_2), 56.2 (CH_3), 122.8, 199.8, 121.4, 123.9, 126.8, 127.9, 128.4, 128.4 (2x), 129.6 (2x), 129.8, 131.0 (tert. C), 121.5, 125.2, 130.9, 131.6, 137.3, 137.6, 149.3, 152.8, 154.0, 155.3, 171.1 (quart. C); HPLC: 100 % bei 254 nm, t_s = 3.587 min, t_m = 2.483 min, (ACN/ H_2O 80:20), Lambda max: 255 nm; $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$ [426.89]; ber. C 73.15, H 4.49, N 6.56; gef. C 73.44, H 4.45, N 6.42.

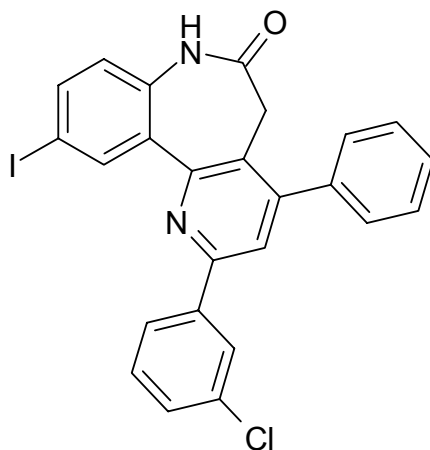
2-(3-Chlorphenyl)-9-methoxy-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (35c)



Nach AAV 7 aus 685 mg (1.53 mmol) 4-[3-(3-Chlorphenyl)-3-oxo-1-phenylpropyl]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33c**), 1.5 g Ammonium Eisen(III)sulfat-Dodecahydrat und 1.8 g Ammoniumacetat.

Farblose Kristalle, Ausbeute 310 mg (47 %); Schmp.: 258.4 °C; IR (KBr): 1687 cm^{-1} (C=O), 1254 cm^{-1} (Ether); ^1H -NMR ([D5]-Pyridin, 400 MHz): δ (ppm) = 3.40-4.20 (b, 2H, Azepin CH_2 , überlappend mit CH_3 -Signal), 3.82 (s, 3H, CH_3) 7.05 (s, 1H, arom. H), 7.11 (d, 1H, J = 8.6 Hz, arom. H), 7.48-7.63 (m, 5H, arom. H, überlappend mit Pyridinsignal), 7.88-7.93 (m, 3H, arom. H), 8.29 (d, 1H, J = 6.6 Hz, arom. H), 8.54 (m, 2H, arom. H), 11.66 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D5]-Pyridin, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.7 (CH_3), 36.6 (Azepin- CH_2), 106.3, 111.6, 120.9, 126.0, 127.7, 129.1, 129.2 (2x), 129.6, 130.7 (2x), 130.9, 135.3 (tert. C), 125.3, 126.4, 133.9, 139.1, 140.2, 141.9, 150.6, 154.0, 155.7, 161.8, 172.1 (quart. C); HPLC: 97.8 % bei 254 nm, t_s = 3.160 min, t_m = 1.100 min (Acetonitril/Wasser 80:20), Lambda max: 250 nm; $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$ [426.89]; ber. C 73.15, H 4.49, N 6.56; gef. C 72.37, H 4.51, N 6.30; HRMS-EI (m/z): ber. 426.1135, gef. 426.1132.

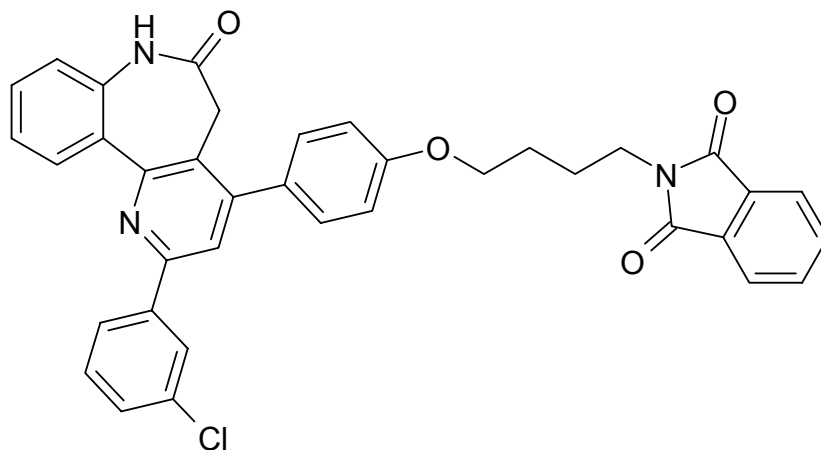
2-(3-Chlorphenyl)-10-iod-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (35d)



Nach AAV 7 aus 1088 mg (2.0 mmol) 4-[3-(3-Chlorphenyl)-3-oxo-1-phenylpropyl]-7-iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33d**), 2.0 g Ammonium Eisen(III)-sulfat-Dodecahydrat und 2.4 g Ammoniumacetat.

Farblose Kristalle, Ausbeute 800 mg (76 %); Schmp.: 324 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3063 cm^{-1} (CH, arom.) 1684 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.40 (bs, 2H, Azepin CH_2 , überlappend mit H_2O -Signal), 7.06 (d, 1H, J = 8.6 Hz, arom. H), 7.52-7.62 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.86 (dd, 1H, J = 8.3/2.0 Hz, arom. H), 8.06 (s, 1H, arom. H), 8.20 ("d", 1H, J = 7.3 Hz, arom. H), 8.28 ("s", 1H, arom. H), 8.45 (d, 1H, J = 2.0 Hz, arom. H), 10.50 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.4 (Azepin- CH_2), 121.2, 123.8, 125.5, 126.2, 128.5 (2x), 128.6, 129.1, 129.7(2x), 130.7, 138.3, 139.0 (tert. C), 88.1, 126.5, 132.8, 133.7, 137.2, 137.2, 140.2, 149.7, 152.8, 153.1, 171.0 (quart. C); HPLC: 99.8 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, t_s = 7.073 min, t_m = 1.098 min, Acetonitril/Wasser (80/20), Lambda max: 243 nm; $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{ClIN}_2\text{O}$ [522.78]; ber. C 57.44, H 3.08, N 5.36; gef. C 57.11, H 2.93, N 5.05.

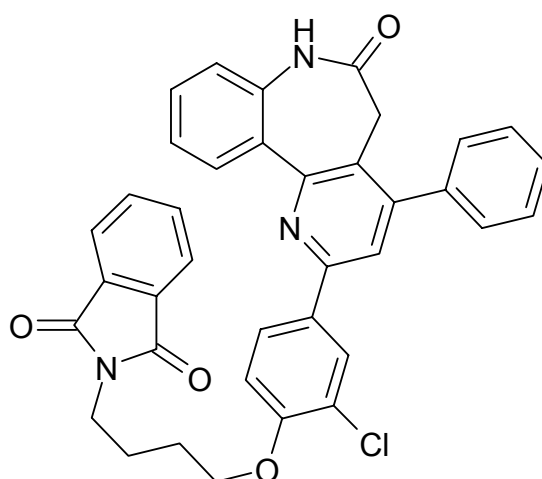
2-(4-{4-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}butyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (37a)



Nach AAV 9 aus 136 mg (0.25 mmol) 4-[4-(4-Brombutoxy)-phenyl]-2-(3-chlorphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**48a**) und 56 mg (0.3 mmol) Phthalimid-Kalium (**42**). Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

Weißes Pulver, Ausbeute 90 mg (59 %); Schmp: 124-130 °C; IR (KBr): 3062 cm^{-1} (CH, arom.), 1716 cm^{-1} (Phthalimid), 1685 cm^{-1} (Amid); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.80 (s, 4H, $-(\text{CH}_2)_2-$), 3.68 (s, 2H, CH_2), 4.11 (s, 2H, CH_2), 7.12 ("d", 2H, $J = 8.65$ Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.25 ("d", 1H, arom. H), 7.37 ("t", 1H, arom. H), 7.48-7.57 (m, 3H, arom. H), 7.63 ("d", 2H, $J = 8.65$ Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.28-7.89 (m, 4H, arom. H des Phthalimids), 8.00 (s, 1H, Pyrido H), 8.18-8.22 (m, 2H, arom. H), 8.30 ("s", 1H, arom. H) 10.43 (s, 1H, NH), das azepinische CH_2 -Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 24.7, 26.0, 35.4 (Azepin CH_2), 37.1, 67.1 (CH_2), 114.4 (2x), 120.6, 121.4, 122.9 (2x), 123.9, 125.4, 126.4, 128.9, 129.9, 130.5, 131.0, 131.1 (2x), 134.3 (2x), (tert. C), 126.1, 129.6, 130.9, 131.6 (2x), 133.7, 137.4, 140.4, 149.1, 152.8, 154.2, 158.8, 167.9 (2x), 171.2 (quart. C); HPLC: 95,9 % bei 254 nm. $t_s = 4.840$, min, $t_m = 1.100$ min (ACN/ H_2O 80:20), Lambda max: 266 nm; $\text{C}_{37}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_4$ [614.11]; ber. C 72.37, H 4.60, N 6.84; gef. C 71.16, H 4.63, N 6.62; HRMS-EI (m/z): ber. 613.1768; gef. 613.1771.

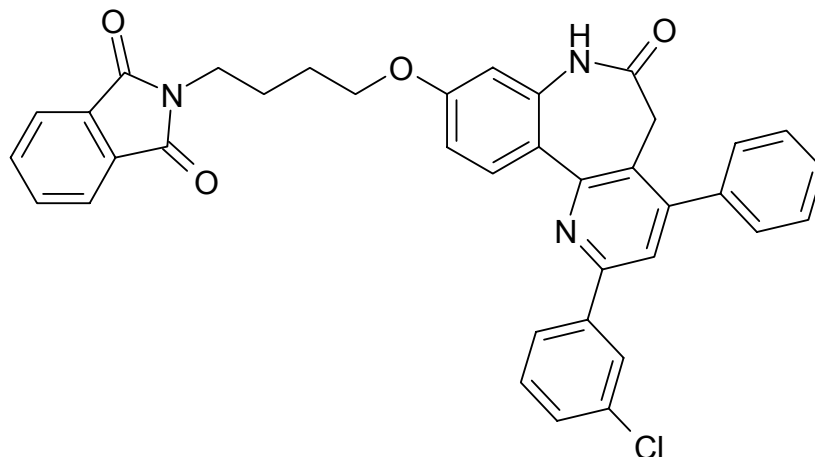
2-{4-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]butyl}-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (37b)



Nach AAV 9 aus 410 mg (0.75 mmol) 2-[4-(4-Brombutoxy)-3-chlorphenyl]-4-phenyl-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**48b**) und 167 mg (0.9 mmol) Phthalimid-Kalium (**42**). Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

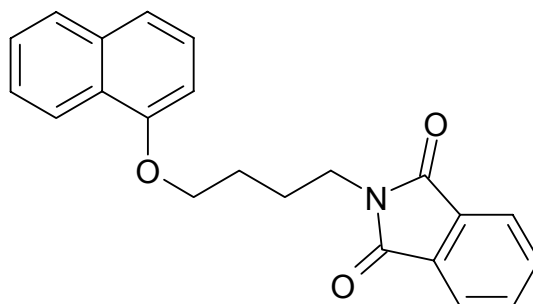
Farbloses amorphes Pulver, Ausbeute 390 mg (84%); Schmp.: 195.8 °C; IR (KBr): 3443 cm⁻¹ (NH), 1705 cm⁻¹ (Phthalimid), 1679 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.81 (s, 4H, -(CH₂)₂-), 3.67 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, CH₂), 4.15 (s, 2H, CH₂), 7.22-7.26 (m, 2H, arom. H), 7.38 ("dt", 1H, *J* = 8.3/7.8/1.0 Hz, arom. H), 7.51-7.55 (m, 2H, arom. H), 7.58-7.61 (m, 2H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.80-7.88 (m, 4H, arom. H des Phthalimids), 7.95 (s, 1H, Pyrido-H), 8.15-8.19 (m, 2H, arom. H), 8.30 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, arom. H), 10.41 (s, 1H, NH), das azepinische CH₂-Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.7, 25.1, 35.0 (Azepin CH₂), 36.2, 67.2 (CH₂), 113.7, 119.7, 121.9, 122.9 (2x), 123.9, 126.7, 127.9, 128.4, 128.5 (2x), 129.7 (2x), 129.8, 131.5, 134.3 (2x) (tert. C), 119.0, 121.4, 125.2, 131.6 (2x), 137.4, 137.6, 149.3, 152.9, 154.0, 154.6, 168.8 (2x), 171.2 (quart. C), ein Signal fehlt aufgrund von Überlagerungen; HPLC: 98.9 % bei 254 nm und 99.0 % bei 280 nm, *t*_s = 3.982 min, *t*_m = 1.098 min (ACN/H₂O 80:20), Lambda max: 256 nm; C₃₇H₂₈ClN₃O₄ [614.11]; ber. C 72.37, H 4.60, N 6.84; gef. C 71.16, H 4.54, N 6.36.

2-(4-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-9-yl]oxy}butyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (37c)



Nach AAV 9 aus 297 mg (0.54 mmol) 9-(4-Brombutoxy)-2-(3-chlorphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**48c**) und 117 mg (0.65 mmol) Phthalimid-Kalium (**42**). Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

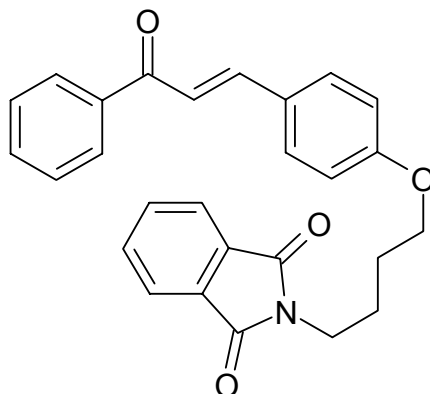
Grauweißes Pulver, Ausbeute 234 mg (70 %); Schmp: 200-210 °C; IR (KBr): 3061 cm⁻¹ (CH, arom.), 2936 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1713 cm⁻¹ (Phthalimid); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.80 (bs, 4H, -(CH₂)₂-), 3.37 (bs, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 3.67 ("s", 2H, CH₂), 4.08 ("s", 2H, CH₂), 6.76 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, arom. H), 6.97 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.5 Hz, arom. H), 7.52-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.82-7.89 (m, 4H, arom. H des Phthalimids), 7.89 (s, 1H, Pyrido-H), 8.12 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, arom. H), 8.21 (dt, 1H, *J* = 7.1/2.0/1.8 Hz, arom. H), 8.29 (s, 1H, arom. H), 10.32 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 24.4, 25.7, 35.4 (Azepin-CH₂), 36.8, 66.9 (CH₂), 106.2, 111.1, 120.0, 122.9 (2x), 125.4, 126.4, 128.1, 128.5 (2x), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 132.4, 134.3 (2x) (tert. C), 123.6, 125.14, 131.6 (2x), 133.7, 137.6, 138.7, 140.5, 149.4, 152.7, 154.2, 159.8, 168.0 (2x), 170.8 (quart. C); HPLC: 98.8 % bei 254 nm und 99.1 % bei 280 nm, *t*_s = 6.000 min, *t*_m = 1.100 min (Acetonitril/Wasser 70:30), Lambda max: 395 nm; C₃₇H₂₈ClN₃O₄ [614.11]; ber. C 72.37, H 4.60, N 6.84; gef. C 72.26, H 4.62, N 6.79.

2-[4-(1-Naphthyloxy)butyl]-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (37d)

216 mg (1.5 mmol) 1-Naphthol (**60**), 423 mg (2.5 mmol) *N*-(4-Bromobutyl)phthalimid (**36**) und 414 mg (3 mmol) Kaliumcarbonat werden in 25 ml Aceton 15 h zum Rückfluss erhitzt. Der abgekühlte Ansatz wird in 50 ml Ethylacetat gegossen, dreimal mit 10 ml Wasser gewaschen, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der resultierende Feststoff wird aus Ethanol umkristallisiert.

Rötliches, amorphes Pulver, Ausbeute 495 mg (54%); Schmelzpunkt: 102.3 °C; IR (KBr): 3043 cm⁻¹ (CH arom.), 2943 cm⁻¹ (CH aliph.), 1773 und 1701 cm⁻¹ (Phthalimid), 1047 cm⁻¹ (Ether); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.87-1.89 (m, 4H, CH₂), 3.70-3.72 (m, 2H, CH₂), 4.16-4.18 (m, 2H, CH₂), 6.94 (dd, 1H, *J* = 7.3/0.8 Hz, H arom.), 7.37-7.53 (m, 4H, H arom.), 7.82-7.88 (m, 5H, 4H des Phthalimids überlagert mit 1H des Naphthols), 8.14 (dd, 1H, *J* = 7.85/1.26 Hz, H arom.); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 24.8, 26.1, 37.2, 67.1 (CH₂), 105.0, 119.7, 121.4, 122.9 (2x), 125.1, 126.1, 126.3, 127.3, 134.3 (2x) (tert. C), 124.8, 131.5, 133.9, 153.9, 167.9 (quart. C); HPLC: 96.3 % bei 254 nm, *t*_s = 5.853, *t*_m = 1.027 (ACN/Wasser+TFA 60:40), Lambda max. 298 nm; HRMS (FAB): ber. [M + H]⁺ = 346.1444, gef [M + H]⁺ = 346.1449; C₂₂H₁₉NO₃ [345.39]; ber. C: 76.50, H: 5.54, N: 4.06; gef. C: 75.79 H: 4.08 N: 5.56.

2-(4-{4-[(1*E*)-3-Oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]phenoxy}butyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol (39)

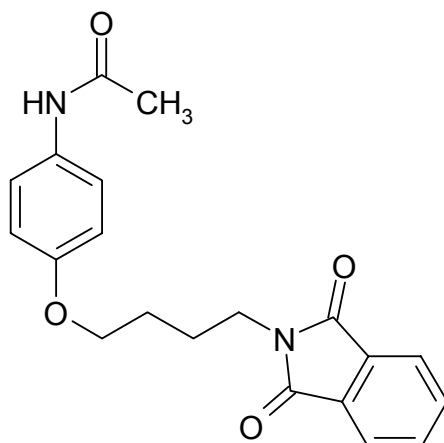


224 mg (1 mmol) (2*E*)-1-Phenyl-3-(4-hydroxy-phenyl)prop-2-en-1-on (**38**) und 282 mg (1 mmol) *N*-(4-Brombutyl)-phthalimid (**36**) werden in 20 ml Aceton gelöst und mit 2.0 g (14.5 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Die Suspension wird 12 h zum Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen auf 200 mg Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wird dreimal mit 50 ml gesättigter Kaliumcarbonatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

Gelbe Kristalle, Ausbeute 300 mg (68 %); Schmp.: 114.8 °C ; IR (KBr): 3065 cm⁻¹ (CH, arom.), 2947 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1717 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.77 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 3.66 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 4.07 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz, CH₂), 6.99 ("d", 2H, *J* = 8.7 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.57 (m, 2H, arom. H), 7.64-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.75 (d, 1H, *J* = 17.8 Hz, H der Doppelbindung), 7.81-7.88 (m, 6H, arom. H und H der Doppelbindung), 8.11-8.14 ("d", 2H, *J* = 8.7 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 24.6, 26.0, 37.1, 67.1 (CH₂), 114.8 (2x), 119.4, 122.9 (2x), 128.3 (2x), 128.6 (2x), 130.7 (2x), 132.8, 134.3 (2x), 143.9 (tert. C), 127.1, 131.6 (2x), 137.8, 160.6, 167.9 (2x), 188.9

(quart. C); $C_{28}H_{27}NO_4$ [441.53]; ber. C 76.17, H 5.45, N 3.29; gef. C 76.03, H 5.49, N 3.25.

N-{4-[4-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)butoxy]phenyl}acetamid (**41**)



Methode A:

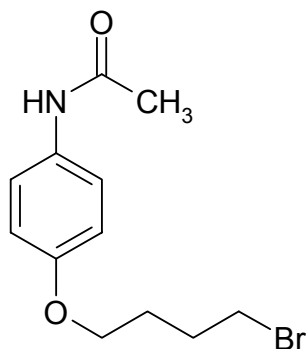
26.4 mg (1.1 mmol) Natriumhydrid werden in 3 ml DMF suspendiert und mit 151 mg (1.0 mmol) Paracetamol (**40**) versetzt und gerührt, bis keine Blasen mehr entstehen. Anschließend werden unter Rühren portionsweise 282 mg (1 mmol) *N*-(4-Brombutyl)-phthalimid (**36**) hinzu gegeben und 3 h zum Rückfluss erhitzt. Der abgekühlte Ansatz wird in 50 ml Ethylacetat gegossen, dreimal mit 10 ml Wasser gewaschen, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der resultierende Feststoff wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 149 mg (42 %) weißes Pulver.

Methode B:

Nach AAV 9 aus 143 mg (0.5 mmol) *N*-[4-(4-Brombutoxy)phenyl]acetamid (**44**) und 111 mg (0.6 mmol) Phthalimid-Kalium (**42**) in 3 ml DMSO. Man erhält 125 mg (71 %) weißes Pulver.

Schmp.: 143.1 °C; IR (KBr): 3253 cm⁻¹ (NH), 1717 cm⁻¹ (C=O, Phthalimid), 1654 cm⁻¹ (C=O, Amid) ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.69-1.73 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 2.00 (s, 3H, CH₃), 3.63 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, CH₂), 3.93 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz, O-CH₂), 6.84 ("d", 2H, *J* = 9.0 Hz arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.45 ("d", 2H, *J* = 9.0 Hz arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.82-7.88 (m, 4H, arom. H des Phthalimids), 9.75 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.7 (CH₃), 24.7, 26.1, 37.1, 67.0 (CH₂), 114.3 (2x), 120.4 (2x), 122.9 (2x), 134.3 (2x), (tert. C), 131.6, 132.5 (2x), 154.2, 167.6, 168.0 (2x), (quart. C); HPLC: 98.5 % bei 254 nm, *t*_s = 2.827 min, *t*_m = 1.027 min (ACN/H₂O 50:50); Lambda max: 239 nm; C₂₀H₂₀N₂O₄ [352.38]; ber. C 68.17, H 5.72, N 7.95; gef. C 68.03, H 5.66, N 7.75.

N-[4-(4-Brombutoxy)phenyl]acetamid (**44**)

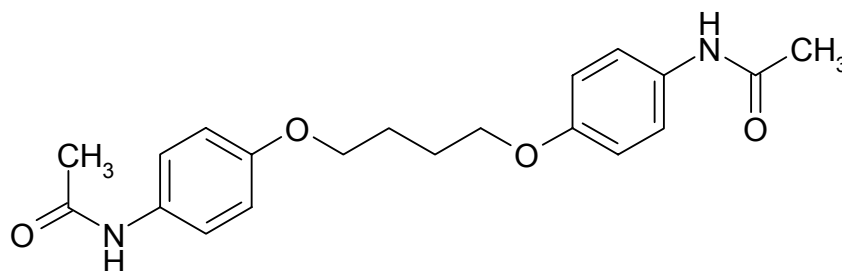


Gemäß AAV 8 aus 756 mg (5 mmol) Paracetamol (**40**), 10.79 g (50 mmol) 1,4-Dibrombutan (**43**) und 690 mg Kaliumcarbonat. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

Farbloses amorphes Pulver; Ausbeute 900 mg (63 %). Schmp.: 98.5°C (Lit.⁵⁴: 100-102); IR (KBr): 3291 cm⁻¹ (NH), 2954 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1662 cm⁻¹ (C=O), 1236 cm⁻¹ (Ether); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.77-1.84 (m, 2H, CH₂), 1.92-1.97 (m, 2H, CH₂), 2.00 (s, 3H, CH₃), 3.60 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, Br-CH₂), 3.95 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, O-CH₂), 6.85 („d“, 2H, *J* = 9.0 Hz, arom. H, Teil

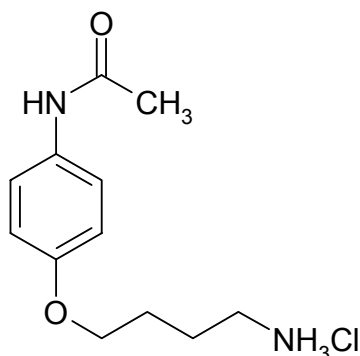
des AA'XX'-Systems), 7.46 („d“, 2H, $J = 9.0$ Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 9.77 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.5 (CH_3), 27.1, 28.8, 34.6, 66.7 (CH_2), 114.1 (2x), 120.2 (2x), (tert. C), 132.5, 154.2, 167.7 (quart. C); $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrNO}_2$ [286.17]; ber. C 50.37, H 5.64, N 4.89; gef. C 50.27, H 5.61, N 4.58.

N,N'-[Butan-1,4-diylbis(oxy-4,1-phenylen)]diacetamid (**45**)



Eine Mischung von 1.51 g (10 mmol) Paracetamol (**40**), 1.38 g (10 mmol) Kaliumcarbonat und 3.23 g (15 mmol) 1,4-Dibrombutan (**43**) wird in 50 Ethanol 1.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird auf Eis gegossen, der Niederschlag abgesaugt und getrocknet. Nach Umkristallisation aus Ethanol/Toluol (1:1), wird das ausgefallene *N*-[4-(4-Brombutoxy)phenyl]-acetamid (**44**) abgesaugt und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

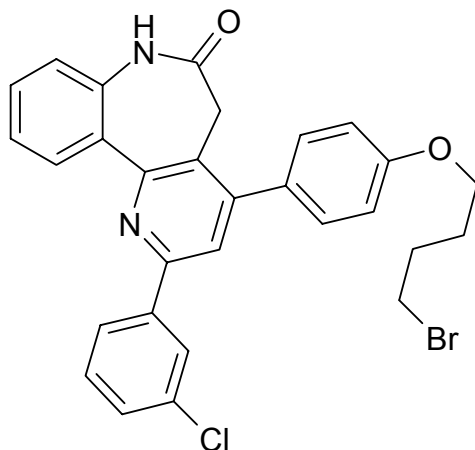
Farbloses Pulver, Ausbeute 420 mg (12%); Schmp.: 236 °C (Lit.¹⁵⁵: 227-228 °C); IR (KBr): 3317 cm^{-1} (NH), 1656 ($\text{C}=\text{O}$), 1239 (Ether) (Lit.¹⁵⁵: 3311 und 1656 cm^{-1}); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.83 (m, 4H, -(CH_2)₂-), 2.00 (s, 6H, 2x CH_3), 3.97 (t, 4H, $J = 5.2$ Hz, 2x O- CH_2), 6.86 („d“, 4H, $J = 9.1$, 2x arom. H, Teile der AA'XX'-Systeme), 7.46 („d“, 4H, $J = 9.1$, 2x arom. Teile der AA'XX'-Systeme), 9.76 (s, 2H, 2x NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.7 (CH_3), 25.4, 67.2 (CH_2), 114.3, 120.2 (tert. C), 132.5, 154.3, 167.6 (quart. C); $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ [356.43]. Aufgrund des stark vom Literaturwert abweichenden Schmelzpunktes wurden zusätzlich die spektroskopischen Daten zur Strukturaufklärung herangezogen.

4-[4-(Acetylamino)phenoxy]-1-butanaminhydrochlorid (46)

352 mg (1 mmol) des *N*-{4-[4-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)butoxy]-phenyl}acetamid (**41**) werden in 5 ml Ethanol suspendiert, mit 100 mg (2 mmol) Hydrazinhydrat versetzt und 2 h unter Stickstoff zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz mit konzentrierter Salzsäure auf pH1 eingestellt. Der resultierende Niederschlag wird abgesaugt und verworfen. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt und anschließend in 25 ml 1 M Natronlauge aufgenommen. Der entstandene Niederschlag wird abermals abgesaugt und in Ethanol gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf pH1 gebracht. Nach dem Einengen im Vakuum wird aus Ethanol umkristallisiert.

Weißes amorphes Pulver, Ausbeute 155 mg (60 %); Schmp.: 212 °C; IR (KBr): 1643 cm⁻¹ (Amid I), 1513 cm⁻¹ (Amid II), 1241 cm⁻¹ (Ether); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.72-1.75 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 2.01 (s, 3H, CH₃), 2.83 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz), 3.93 (t, 2H, O-CH₂, *J* = 5.6 Hz), 6.85 („d“, 2H, *J* = 9.0 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.51 („d“, 2H, *J* = 9.0 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 8.14 (s, 3H, NH₃⁺), 9.99 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 24.8 (CH₃), 24.9, 26.8, 39.5, 68.0 (CH₂), 115.3 (2x), 121.5 (2x) (tert. C), 132.7, 154.2, 167.7 (quart. C); C₁₂H₁₉ClN₂O₂ [258.75]; ber. C 55.70, H 7.40, N 10.83; gef. C 53.80 H 7.19, N 10.42.

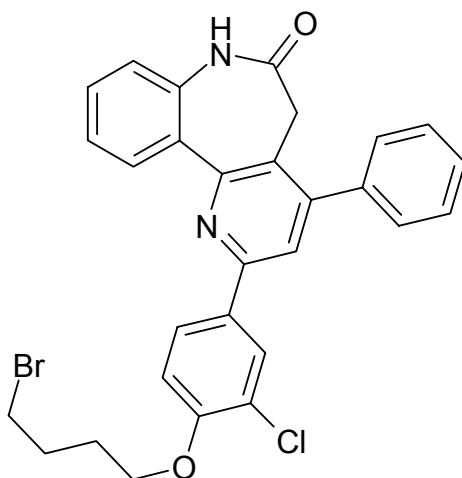
4-[4-(4-Brombutoxy)phenyl]-2-(3-chlorphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6-on (48a)



Nach AAV 8 aus 206 mg (0.5 mmol) 2-(3-Chlorphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**32a**), 1080 mg (5 mmol) 1,4-Dibrombutan (**43**) und 69 mg Kaliumcarbonat. Die Substanz wird ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

Weißes Pulver, Ausbeute 160 mg (58 %); Schmp.: 170 °C; IR (KBr): 3215 cm⁻¹ (NH), 3066 cm⁻¹ (CH, arom.), 1676 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.87-2.06 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 3.40-3.60 (b, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 3.65 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂), 4.13 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, O-CH₂), 7.15 ("d", 2H, *J* = 8.7 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.25 ("d", 1H, *J* = 8.1 Hz, arom. H), 7.38 ("dt", 1H, *J* = 8.1/7.9/1.0 Hz, arom. H), 7.52-7.57 (m, 3H, arom. H), 7.65 ("d", 2H, *J* = 8.7 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 8.01 (s, 1H, Pyrido H), 8.19-8.23 (m, 2H, arom. H), 8.30 ("t", 1H, *J* = 1.8 Hz, arom. H) 10.43 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 27.3, 29.0, 34.7 (CH₂), 35.4 (Azepin CH₂), 66.7 (O-CH₂), 114.4 (2x), 120.5, 121.4, 123.9, 125.4, 126.4, 128.9, 129.9, 130.5, 131.0, 131.1 (2x), (tert. C), 126.1, 129.6, 130.8, 133.6, 137.4, 140.4, 149.1, 152.8, 154.2, 158.8, 171.2 (quart. C); C₂₉H₂₄BrClN₂O₂ [547.87].

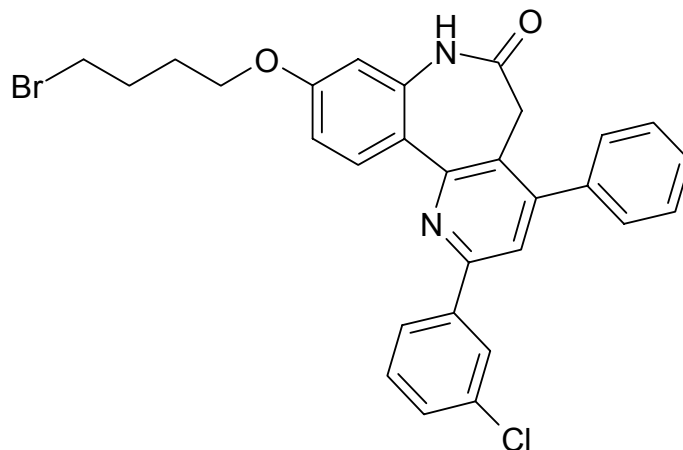
2-[4-(4-Brombutoxy)-3-chlorphenyl]-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6-on (48b)



Nach AAV 8 aus 413 mg (1 mmol) 2-(3-Chlorphenyl-4-hydroxy)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**32b**), 2160 mg (10.0 mmol) 1,4-Dibrombutan (**43**) und 138 mg Kaliumcarbonat. Die Substanz wird ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Farbloses Pulver, Ausbeute 414 mg (76 %); Schmp.: 188 °C; IR (KBr): 3066 cm^{-1} (CH, arom.), 2920 cm^{-1} (CH, aliph.), 1685 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.89-2.06 (m, 4H, $-(\text{CH}_2)_2-$), 3.3-3.8 (b, 2H, Azepin CH_2), 3.65 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH_2), 4.18 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH_2), 7.24-7.27 (m, 2H, arom. H), 7.35 (t, 1H, $J = 7.1$, arom. H), 7.51-7.67 (m, 6H, arom. H), 7.98 (s, 1H, Pyrido H), 8.17-8.20 (m, 2H, arom. H), 8.34 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, arom. H), 10.41 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 27.2, 29.1, 34.7 (CH_2), 35.4 (Azepin CH_2), 67.9 (CH_2), 113.7, 119.7, 121.5, 123.9, 126.7, 128.0, 128.4, 128.5 (2x), 129.7 (2x), 129.8, 131.1 (tert. C), 121.8, 125.2, 130.9, 131.6, 137.4, 137.6, 149.3, 152.9, 154.0, 154.6, 171.2 (quart. C); $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{BrClN}_2\text{O}_2$ [547.87].

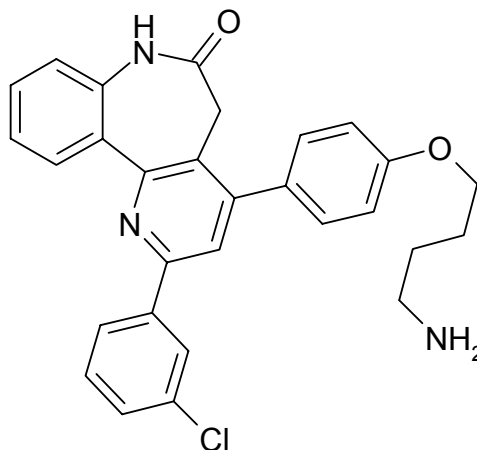
9-(4-Brombutoxy)-2-(3-chlorophenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6-on (48c)



Nach AAV 8 aus 62 mg (0.15 mmol) 2-(3-Chlorophenyl)-9-hydroxy-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**32c**), 324 mg (1.5 mmol) 1,4-Dibrombutan (**43**) und 21 mg Kaliumcarbonat. Substanz wird ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Farbloses Pulver, Ausbeute 45 mg (55 %); Schmp.: 252 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3190 cm⁻¹ (NH), 3062 cm⁻¹ (CH, arom.), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.86-2.04 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 3.38 (b, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 3.63 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂), 4.10 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, O-CH₂), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, arom. H), 6.99 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.5 Hz, arom. H), 7.52-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.98 (s, 1H, Pyrido H), 8.14 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, arom. H), 8.21 ("dt", 1H, *J* = 6.8/1.8/1.5 Hz, arom. H), 8.30 (s, 1H, arom. H), 10.34 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 27.3, 29.0, 34.7 (CH₂), 35.6 (Azepin CH₂), 66.8 (O-CH₂), 106.3, 111.0, 120.0, 125.4, 126.4, 128.4, 128.5, 128.9, 129.7, 130.6, 132.4 (tert. C), 123.6, 125.2, 133.7, 137.6, 138.7, 140.5, 149.4, 152.7, 154.2, 159.7, 170.8 (quart. C); C₂₉H₂₄BrClN₂O₂ [547.87].

4-{4[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]-phenoxy}-1-butanamin (49a)

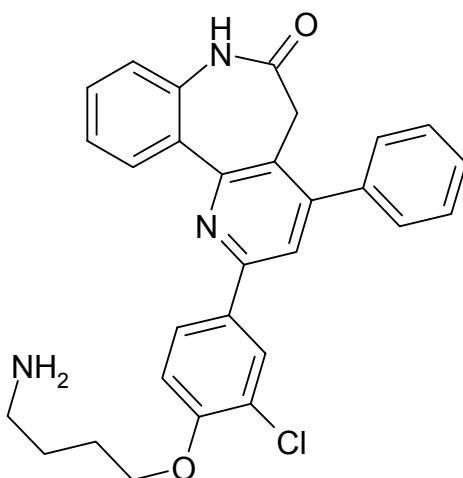


Nach AAV 10 aus 881 mg (1.43 mmol) 2-(4-{4[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}butyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (**37a**) und 143 mg (2.87 mmol) Hydrazinmonohydrat.

Weißes Pulver, Ausbeute 513 mg (74 %); Schmp.: thermische Zersetzung ab 220 °C. IR (KBr): 3431 cm⁻¹ (NH₂), 2933 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1674 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.48-1.55 (m, 2H, CH₂), 1.75-1.82 (m, 2H, CH₂), 2.60 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂), 3.39 (bs, NH₂-Protonen, welche als ein Signal zusammen mit dem stark verbreiterten Wasserpeak erscheinen), 4.06 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, CH₂), 6.86 ("dt", 1H, *J* = 8.04/7.96/1.2 Hz, arom. H), 6.94 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.0 Hz, arom. H), 7.08 ("d", 2H, *J* = 8.9 Hz, arom. H., Teil des AA'XX'-Systems), 7.24 (dt, 1H, 8.39/7.13/1.66 Hz, arom. H), 7.46-7.55 (m, 2H, arom. H), 7.86 (s, 1H, Pyrido H), 7.99-8.06 (m, 3H, arom. H), 8.19 (ddd, 1H, *J* = 7.66/1.39/1.30 Hz, arom. H), 8.28 (dd, 1H, *J* = 1.8/1.7 Hz, arom. H), das Signal des Lactams fehlt aufgrund des schnellen Protonenaustauschs mit der freien Aminogruppe. Das azepinische CH₂-Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 26.0, 29.6, 35.4 (Azepin CH₂), 41.0, 67.3 (CH₂), 114.4 (2x), 120.6, 121.5, 123.9, 125.4, 126.4, 128.9, 129.9, 130.6, 130.9, 131.2 (2x) (tert. C), 126.1 129.5,

131.1, 133.7, 137.4, 140.5, 149.2, 152.8, 154.2, 159.0, 171.2 (quart. C); HPLC: 99.9 % bei 254 nm und 99.9 % bei 280 nm, t_s = 5,142 min, t_m = 1.025 min (ACN/H₂O+TFA 80:20), Lambda max: 265 nm; C₂₉H₂₆ClN₃O₂ [484,00]; ber. C 71.79, H 5.41, N 8.68; gef. C 70.26, H 5.66, N 8.12.

4-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]-1-butanamin (**49b**)

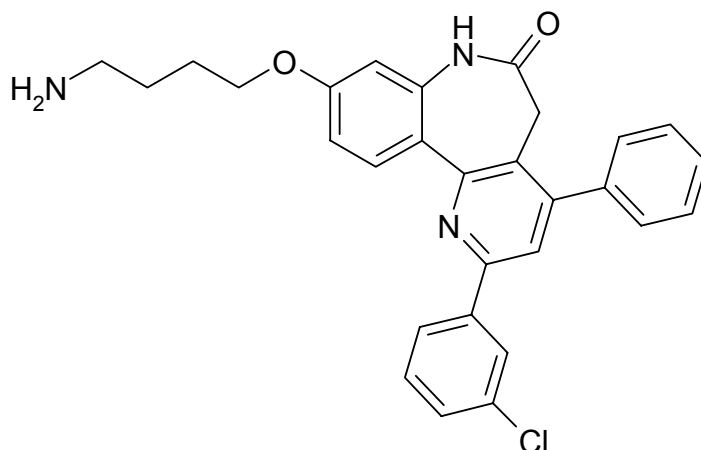


Nach AAV 10 aus 881 mg (1.43 mmol) 2-{4-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]butyl}-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (**37b**) und 143 mg (2.87 mmol) Hydrazinmonohydrat.

Weißes Pulver, Ausbeute 635 mg (91 %); Schmp.: 179.7 °C; IR (KBr): 3441 cm⁻¹ (NH), 2933 cm⁻¹ (CH, aliph), 1674 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.55-1.62 (m, 2H, CH₂), 1.77-1.84 (m, 2H, CH₂), 2.67 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂), 3.36 (bs, NH₂-Protonen, welche als ein Signal zusammen mit dem stark verbreiterten Wasserpeak erscheinen), 4.13 (t, 2H, J = 6.3 Hz, CH₂), 7.23-7.27 (m, 2H, arom. H), 7.38 (t, 1H, J = 7.2 Hz, arom. H), 7.52-7.61 (m, 4H, arom. H), 7.65-7.67 (m, 2H, arom. H), 7.96 (s, 1H, Pyrido H), 8.17-8.20 (m, 2H, arom. H), 8.33 (d, 1H, J = 2.1 Hz, arom. H), das Signal des Lactamprotons fehlt aufgrund des schnellen Protonenaustauschs mit der freien Aminogruppe. Das

azepinische CH₂-Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 25.9, 28.2, 35.4 (Azepin-CH₂), 40.6, 68.6 (CH₂), 113.7, 119.7, 121.5, 123.9, 126.7, 128.0, 128.4, 128.5 (2x), 129.7 (2x), 129.8, 131.0 (tert. C), 121.8, 125.2, 131.0, 131.5, 137.4, 137.6, 149.3, 152.9, 154.0, 154.7, 171.2 (quart. C); HPLC: 99.3 % bei 254 nm und 99.2 % 280 nm, t_s = 2.157 min, t_m = 1.023 min (ACN/H₂O+TFA 80:20), Lambda max: 256 nm; C₂₉H₂₆ClN₃O₂ [484,00]; ber. C 71.79, H 5.41, N 8.68; gef. C 71.14, H 5.50, N 8.11.

4-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benz-azepin-9-yl]oxy}-1-butanamin (**49c**)

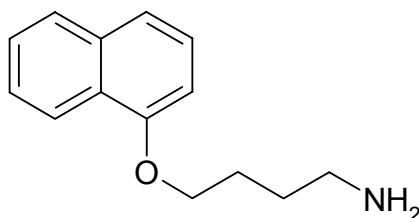


Nach AAV 10 aus 881 mg (1.43 mmol) 2-(4-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benz-azepin-9-yl]oxy}butyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (**37c**) und 143 mg (2.87 mmol) Hydrazinmonohydrat.

Weises Pulver, Ausbeute 297 mg (42.9 %); Schmp.: 266.4 °C; IR (KBr): 3061 cm⁻¹ (CH, arom), 2937 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1680 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.74-1.87 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 2.85-2.90 (m, 2H, CH₂), 3.36 (bs, NH₂-Protonen, welche als ein Signal zusammen mit dem stark verbreiterten Wasserpeak erscheinen), 4.08-4.11 (m, 2H, CH₂), 6.80 (d, 1H, J =

2.4 Hz, arom. H), 7.00 (dd, 1H, $J = 8.8/2.4$ Hz, arom. H), 7.51-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.99 (s, 1H, Pyrido-H), 8.14 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, arom. H), 8.21 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, arom. H), 8.30 (s, 1H, arom. H), das Signal des Lactamprotons fehlt aufgrund des schnellen Protonenaustauschs mit der freien Aminogruppe. Das azepinische CH₂-Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 28.8, 29.3, 35.4 (Azepin-CH₂) 41.0, 67.5 (CH₂), 106.2, 111.1, 120.0, 125.4, 126.4, 128.4 (überlagert mit Peak bei 128.5), 128.5 (2x), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 132.4 (tert. C.), 123.5, 125.1, 133.7, 137.6, 138.7, 140.5, 149.4, 152.7, 154.3, 159.9, 170.8 (quart. C); HPLC: 99.8 % bei 254 nm und 99.8 % bei 280 nm, $t_s = 5.477$ min, $t_m = 1.090$ min (ACN/H₂O+TFA 80:20), Lambda max: 256 nm; C₂₉H₂₆ClN₃O₂ [484,00]; ber. C 71.79, H 5.41, N 8.68; gef. C 66.04, H 5.41, N 7.91.

4-(1-Naphthyloxy)-1-butanamin (49d)

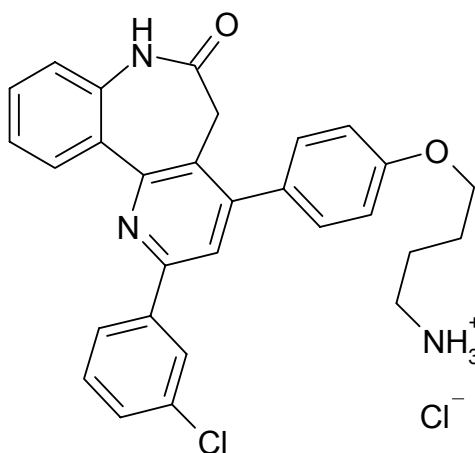


Gemäß AAV 14 aus 120 mg (0.35 mmol) 2-[4-(1-Naphthyloxy)butyl]-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol (**37d**) und 105 mg (2.1 mmol) Hydrazinmonohydrat in Methanol 1 h zum Rückfluss erhitzten.

Braunes Öl, Ausbeute 64 mg (85 %); IR (NaCl): 2936 cm⁻¹ (CH aliph.), 1100 cm⁻¹ (Ether); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.59-1.92 (m, 4H, CH₂), 2.65-2.69 (m, 2H, CH₂), 4.13-4.17 (m, 2H, CH₂), 6.94 (dd, 1H, $J = 7.4/0.8$ Hz, H arom.), 7.38-7.54 (m, 4H, H arom.), 7.85-7.87 (m, 1H, H arom.), 8.16-8.18 (m, 1H, H arom); MS (EI): m/z (%) = 215.1 [M]⁺ (2), 72.1 (100), 44.0

(22); HPLC: 99.7 % bei 254 nm und 99.8 % bei 280 nm, $t_s = 3.963$, $t_m = 1.044$ (ACN/Wasser+(Et₃NH)₂SO₄), Lambda max. 264 nm; C₁₄H₁₇NO × ½ H₂O [224.30]; ber. C 74.97, H 8.02, N 6.37; gef. C 74.61, H 8.03, N 6.45.

4-{4[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]-phenoxy}-1-butanaminhydrochlorid (50a)

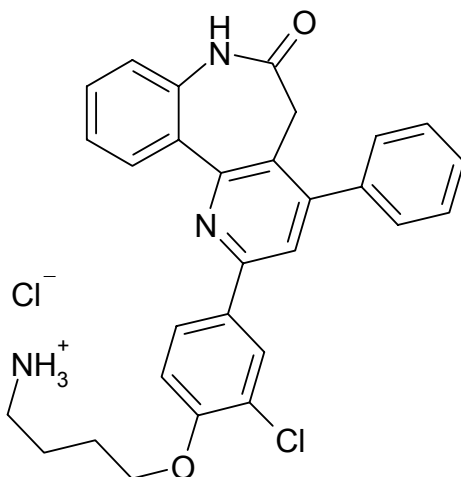


Nach AAV 10 und anschließender Behandlung nach AAV 11. Aus 154 mg (0.25 mmol) 2-(4-{4-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}butyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (**37a**) und 25 mg (0.5 mmol) Hydrazinmonohydrat.

Weißes Pulver, Ausbeute 30 mg (23 %); Schmp.: 294.8 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3433 cm⁻¹ (NH), 2927 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1674 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.74-1.88 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 2.89 (s, 2H, CH₂), 3.10-3.70 (b, 2H, Azepin CH₂, überlappend mit H₂O-Signal), 4.12 (t, 2H, CH₂, $J = 6.3$ Hz), 7.14-7.17 ("d", 2H, $J = 8.6$, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.25 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, arom. H), 7.38 ("dt", 1H, $J = 7.9/7.3/1.0$ Hz, arom. H), 7.51-7.57 (m, 3H, arom. H), 7.65-7.67 ("d", 2H, $J = 8.6$, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 8.01 (s, 1H, Pyrido H, überlappend mit NH₃⁺-Signal), 8.06 (s, 3H, NH₃⁺), 8.18-8.23 (m, 2H, arom. H), 8.28 (t, 1H, $J = 1.8$ Hz, arom. H), 10.45 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.9, 25.7,

35.5 (Azepin CH₂), 38.5, 67.1 (CH₂), 114.4 (2x), 120.6, 121.5, 125.4, 126.2, 126.4, 128.9, 129.9, 130.6, 131.1, 131.2 (2x) (tert. C), 129.7, 130.9, 131.1, 133.7, 137.4, 140.5, 149.1, 152.8, 154.3, 158.8, 171.2 (quart. C); HPLC: 98.5 % bei 254 nm und 98.4 % bei 280 nm, t_s = 5.328 min, t_m = 1.012 min (ACN/H₂O+TFA 30:70), Lambda max: 265 nm; C₂₉H₂₇Cl₂N₃O₂ [520.46]; ber. C 66.93, H 5.23, N 8.07; gef. C 65.81, H 5.16, N 7.56; HRMS (ESI) (m/z): ber. [M + H]⁺ = 484.1792, gef. [M + H]⁺ = 484.1780.

4-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]-1-butanaminhydrochlorid (50b)

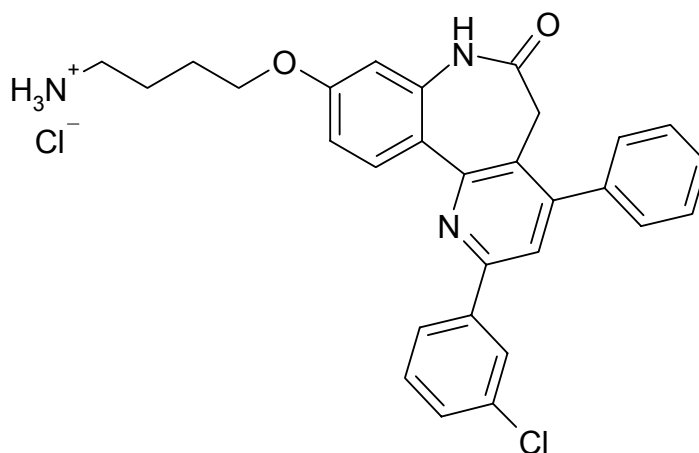


Nach AAV 10 und anschließender Behandlung nach AAV 11. Aus 125 mg (0.2 mmol) 2-{4-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]butyl}-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (**37b**) mit 50 mg Hydrazinmonohydrat.

Weißes Pulver, Ausbeute 56 mg (52%); Schmp.: 265 °C; IR (KBr): 3053 cm⁻¹ (CH, arom.), 2926 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.77-1.88 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 2.89 (m, 2H, aliph. H), 4.17 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz, aliph. H), 7.27 (m, 2H, arom. H), 7.38 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, arom. H), 7.52-7.62 (m, 4H, arom. H), 7.65-7.67 (m, 2H, arom. H), 7.89 (s, 1H, Pyrido

H), 8.08 (bs, 3H, NH_3^+) 8.17-8.22 (m, 2H, arom. H), 8.35 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, arom. H), 10.43 (s, 1H, Lactam NH), das azepinische CH_2 -Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.9, 25.6, 35.4 (Azepin- CH_2), 39.5, 68.25 (CH_2), 113.8, 119.8, 121.5, 123.9, 126.8, 128.0, 128.4, 128.5 (2x), 129.7 (2x), 129.9, 131.0, (tert. C), 121.8, 125.3, 131.0, 131.7, 137.4, 137.6, 149.4, 152.9, 154.0, 154.6, 171.8 (quart. C); HPLC: 99.6 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, $t_s = 3.164$ min, $t_m = 1.023$ min (ACN/ H_2O +TFA 25:75), λ_{max} : 256 nm; $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ [520.46]; ber. C 66.93, H 5.23, N 8.07; gef. C 66.05, H 5.36, 7.86; HRMS (ESI) (m/z): ber. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 484.1792$, gef. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 484.1775$.

4- $\{[2-(3\text{-Chlorphenyl})-6\text{-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido}[3,2-d][1]\text{benzazepin-9-yl}\}$ oxy $\}$ -1-butanaminhydrochlorid (**50c**)

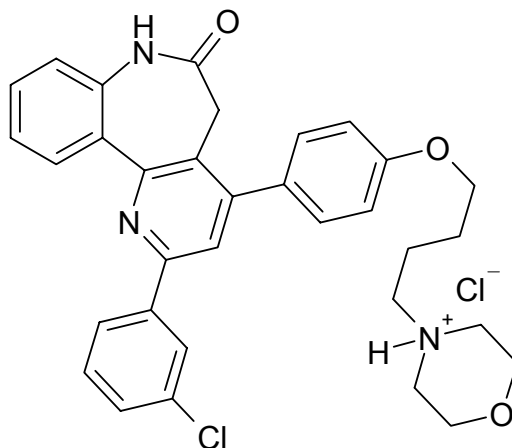


Nach AAV 10 und anschließender Behandlung nach AAV 11 aus 154 mg (0.25 mmol) 2-(4- $\{[2-(3\text{-Chlorphenyl})-6\text{-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido}[3,2-d][1]\text{benzazepin-9-yl}\}$ oxy $\}$ butyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (**37c**) unter Verwendung von 25 mg (0.5 mmol) Hydrazinmonohydrat.

Farbloses Pulver, Ausbeute 67 mg (52%); Schmp.: 292.7 °C; IR (KBr): 2916 cm^{-1} (CH, aliph.), 1661 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) =

1.77.-1.85 (m, 4H, $-(\text{CH}_2)_2-$), 2.88 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.7$ Hz), 4.09 (t, 2H, CH_2 , $J = 5.6$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, arom. H), (dd, 1H, $J = 8.6/2.3$ Hz, arom. H), 7.51-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.99 (s, 1H, Pyrido H), 8.10 (b, 3H, NH_3 -Signal, überlappend mit benachbarten Signalen), 8.14 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, arom. H), 8.21 (dt, 1H, $J = 7.1/2.0/1.5$ Hz, arom. H), 8.30 (s, 1H, arom. H), 10.40 (s, 1H, NH des Lactams), das azepinische CH_2 -Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.9, 25.6, 35.7 (Azepin CH_2) 38.5, 67.2 (CH_2), 106.4, 111.0, 120.1, 125.4, 126.4, 128.5 (Überlagerung von drei Signalen), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 132.5 (tert. C.), 123.7, 125.2, 133.7, 137.6, 138.7, 140.5, 149.4, 152.7, 154.2, 159.7, 170.8 (quart. C); HPLC: 99.7 % bei 254 nm und 99.6 % bei 280 nm, $t_s = 5.503$, min, $t_m = 1.010$ min (ACN/ H_2O +TFA 30:70), Lambda max: 256 nm; $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ [520.46]; ber. C 66.93, H 5.23, N 8.07; gef. C: 65.13, H 5.23, N 7.56; HRMS (ESI) (m/z): ber. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 484.1792$, gef. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 484.1780$.

4-(4-{4-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}butyl)morpholinhydrochlorid (51a)

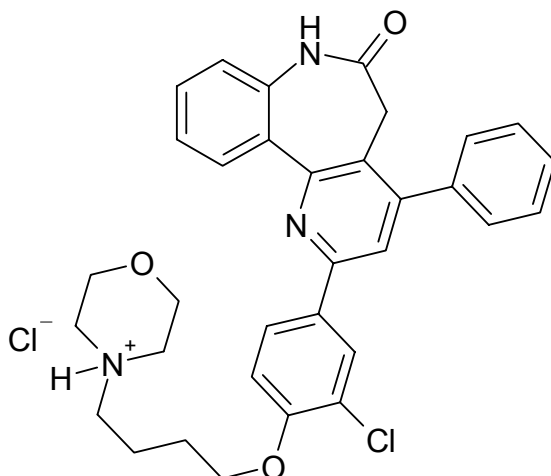


Nach AAV 12 aus 137 mg (0.25 mmol) 4-[4-(4-Brombutoxy)phenyl]-2-(3-chlorphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**48a**) und 48 mg (0.55 mmol) Morpholin.

Farbloses Pulver, Ausbeute 56 mg (35 %); Schmp.: 145°C (Zersetzung); IR (KBr): 3429 cm⁻¹ (NH), 2930 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1674 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.83-1.93 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 3.04-3.17 (m, 4H, CH₂), 3.41-3.44 (m, 2H, CH₂), 3.82 (t, 2H, *J* = 11.6 Hz, CH₂), 3.96-3.97 (m, 2H, CH₂), 4.11-4.14 (m, 2H, CH₂), 7.16 ("d", 2H, *J* = 8.6 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.26 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, arom. H), 7.38 ("t", 1H, *J* = 7.4, arom. H), 7.53-7.57 (m, 3H, arom. H), 7.66 ("d", 2H, *J* = 8.6 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 8.00 (s, 1H, Pyrido H), 8.19-8.22 (m, 2H, arom. H), 8.30 ("s", 1H, arom. H), 10.43 (s, 1H, NH), 11.17 (s, 1H, N⁺H), das azepinische CH₂-Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 19.7, 25.8, 35.4 (Azepin CH₂), 50.6, 55.5, 63.1, 67.0 (CH₂), 114.4 (2x), 120.6, 121.5, 125.4, 126.1, 126.4, 129.0, 129.9, 130.6, 131.1, 131.2 (2x) (tert. C), 129.7, 130.9, 133.7, 137.4, 140.4, 149.1, 152.8, 154.2, 158.8, 171.2 (quart. C, ein Signal fehlt aufgrund von Überlagerungen); HPLC: 98.1 % bei 254 nm und 98.1 % bei 280 nm, *t*_s = 4.302 min, *t*_m = 1.045 min (ACN/H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 37:63), Lambda max: 264 nm;

$C_{33}H_{33}Cl_2N_3O_3$ [590.55]; ber. C 67.12, H 5.63, N 7.12; gef. C 66.53, H 5.90, N 6.96; HRMS (ESI): ber. $[M + H]^+ = 554.2210$, gef. $[M + H]^+ = 554.2201$.

4-{4-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]butyl}morpholinhydrochlorid (51b)

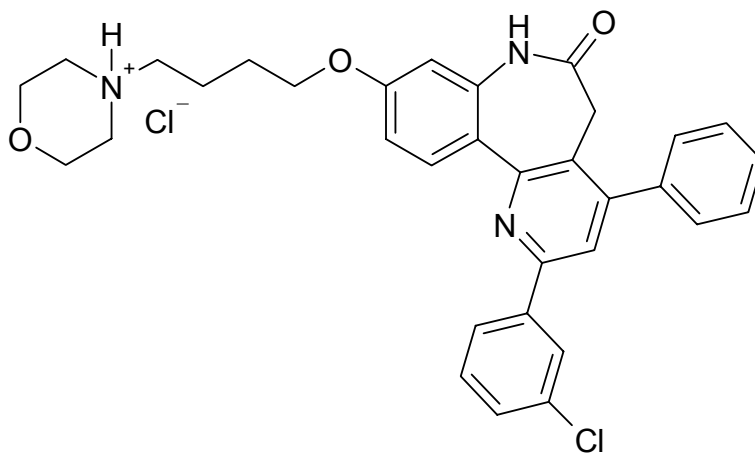


Nach AAV 12 aus 137 mg (0.25 mmol) 2-[4-(4-Brombutoxy)-3-chlorphenyl]-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**48b**) und 48 mg (0.55 mmol) Morpholin.

Farbloses Pulver, Ausbeute 102 mg (69%); Schmp.: 120°C (Zersetzung); IR (KBr): 3429 cm^{-1} (NH), 2925 cm^{-1} (CH, aliph.), 1675 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.84-1.96 (m, 4H, $-(\text{CH}_2)_2-$), 2.99-3.08 (m, 2H, CH_2), 3.13-3.21 (m, 2H, CH_2), 3.39-3.42 (m, 2H, CH_2), 3.84 (t, 2H, $J = 11.6$ Hz, CH_2), 3.95 (dd, 2H, $J = 12.5/2.7$ Hz, CH_2), 4.17-4.20 (m, 2H, CH_2), 7.24-7.29 (m, 2H, arom. H), 7.38 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, arom. H), 7.52-7.62 (m, 4H, arom. H), 7.66-7.67 (m, 2H, arom. H), 7.98 (s, 1H, Pyrido H), 8.17-8.22 (m, 2H, arom. H), 8.35 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, arom. H), 10.41 (s, 1H, Lactam NH), 11.17 (s, 1H, N^+H), das azepinische CH_2 -Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak überdeckt; $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 19.7, 25.8, 35.4 (Azepin- CH_2), 50.9, 55.6, 63.1, 68.1 (CH_2), 113.8, 119.8, 121.5,

123.9, 126.8, 128.0, 128.4, 128.5 (2x), 129.7 (2x), 129.9, 130.9 (tert. C), 121.9, 125.3, 131.0, 131.7, 137.4, 137.6, 149.4, 152.8, 154.0, 154.6, 171.2 (quart. C); HPLC: 95.3 % bei 254 nm und 94.7 % bei 280 nm, t_s = 4.355 min, t_m = 1.025 min (ACN/H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 30:70), Lambda max: 255 nm; C₃₃H₃₃Cl₂N₃O₃ [590.55]; HRMS (ESI): ber. [M + H]⁺ = 554.2210, gef. [M + H]⁺ = 554.2202.

4-(4-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-9-yl]oxy}butyl)morpholinhydrochlorid (51c)

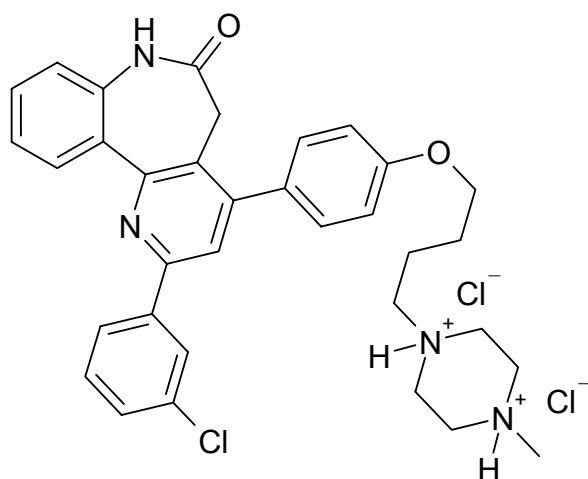


Nach AAV 12 aus 137 mg (0.25 mmol) 9-(4-Brombutoxy)-2-(3-chlorphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**48c**) und 48 mg (0.55 mmol) Morpholin.

Farbloses Pulver, Ausbeute 75 mg (43%); Schmp.: 155 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3349 cm⁻¹ (NH), 2928 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.81-1.95 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 3.00-3.09 (m, 2H, CH₂), 3.12-3.18 (m, 2H, CH₂), 3.39-3.45 (m, 2H, CH₂), 3.82-3.91 (m, 2H, CH₂), 3.92-3.97 (m, 2H, CH₂, das Signal wird vom Wasserpeak überlagert), 4.11 (m, 2H, CH₂), 6.81 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, arom. H), (dd, 1H, *J* = 8.8/2.5 Hz, arom. H), 7.51-7.62 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 8.00 (s, 1H, Pyrido H), 8.14 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, arom. H), 8.21 (ddd, 1H, *J* = 7.1./1.8./1.5 Hz, arom. H), 8.30 (s, 1H, arom. H), 10.41 (s, 1H, NH des Lactams), 11.39 (s, 1H, N⁺H), das azepinische CH₂-Signal erscheint stark verbreitert und wird vom Wasserpeak

überdeckt; ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 20.0, 25.7, 35.7 (Azepin-CH₂), 50.5, 55.5, 63.1, 67.0 (CH₂), 106.4, 111.0, 120.1, 125.4, 126.4, 128.5 (Überlagerung von drei Signalen), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 132.5 (tert. C.), 123.7, 125.2, 133.7, 137.6, 138.7, 140.5, 149.4, 152.7, 154.2, 159.7, 170.8 (quart. C); HPLC: 98.9 % bei 254 nm und 95.5 % bei 280 nm, t_s = 6.364 min, t_m = 1.023 min (ACN/H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 40:60), Lambda max: 250 nm; C₃₃H₃₃Cl₂N₃O₃ [590.55]; HRMS (ESI): ber. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 554.2210$, gef. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 554.2200$.

1-(4-{4-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}butyl)-4-methylpiperazindihydrochlorid (52a)

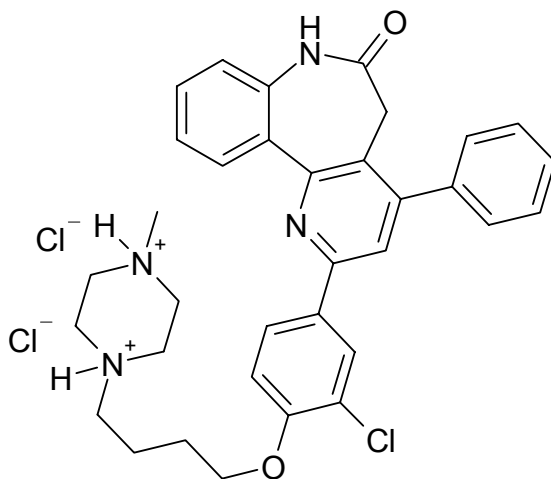


Nach AAV 12 aus 137 mg (0.25 mmol) 4-[4-(4-Brombutoxy)phenyl]2-(3-chlorphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**48a**) und 48 mg (0.48 mmol) N-Methylpiperazin.

Gelbes, amorphes Pulver, Ausbeute 45 mg (28 %); Schmp.: 95 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3431 cm⁻¹ (NH), 2928 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1674 cm⁻¹ (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.83.-1.99 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 2.89 (s, 3H, CH₃), 3.54 (bs, 2H, CH₂), 3.42-3.62 (m, 6H, aliph. und azepinische CH₂-Gruppe), 3.70-3.72 (m, 2H, CH₂), 3.79-3.82 (m, 2H, CH₂), 4.11-4.14 (m, 2H,

CH₂), 7.15-7.18 ("d", 2H, J = 8.6 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.27 (d, 1H, J = 7.6 Hz, arom. H), 7.38 (dt, 1H, J = 7.3/0.8 Hz, arom. H), 7.51-7.57 (m, 3H, arom. H), 7.65-7.67 ("d", 2H, J = 8.6, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 8.01 (s, 1H, Pyrido H), 8.18-8.22 (m, 2H, arom. H), 8.28 (s, 1H, arom. H), 10.45 (s, 1H, H des Lactams), 12.16 (bs, 2H, N⁺H); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 34.0 (CH₃), 20.0, 25.7, 35.7 (Azepin-CH₂) 47.9, 59.4., 55.3, 67.0 (CH₂), 114.5 (2x), 120.6, 121.5, 125.4, 126.2, 126.4, 128.9, 129.9, 130.6, 131.2 (2x) (tert. C, ein Signal fehlt aufgrund von Überlagerungen), 129.7, 130.9, 131.1, 133.7, 137.4, 140.5, 149.2, 152.8, 154.2, 158.8, 171.2 (quart. C); HPLC: 97.5 % bei 254 nm und 96.6 % bei 280 nm, t_s = 6.406 min, t_m = 1.027 min (ACN/H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 30:70), Lambda max: 263 nm; C₃₄H₃₇Cl₃N₄O₂ [640.05]; ber. C 66.93, H 5.23, N 8.07; gef. C 65.81, H 5.16, N 7.56; MS (HR-ESI): ber. [M + H]⁺ = 567.2527, gef. [M + H]⁺ = 567.2533.

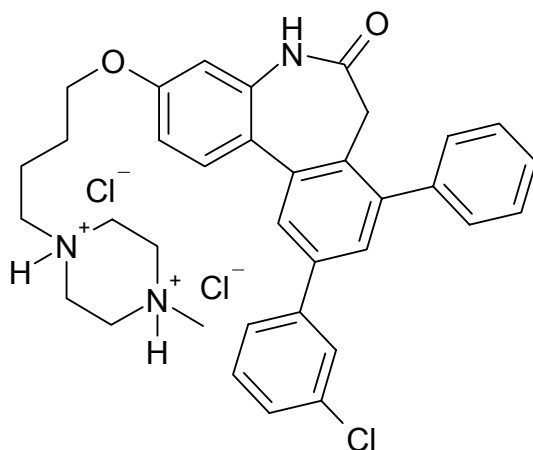
1-{4-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]butyl}-4-methylpiperazindihydrochlorid (52b)



Nach AAV 12 aus 120 mg (0.22 mmol) 2-[4-(4-Brombutoxy)-3-chlorphenyl]-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**48b**) und 48 mg (0.48 mmol) *N*-Methylpiperazin.

Gelbes, amorphes Pulver, Ausbeute 56 mg (40%); Schmp.: 220°C (Zersetzung); IR (KBr): 3053 cm^{-1} (CH arom.), 2926 cm^{-1} (aliph.H), 1685 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.81.-1.93 (m, 4H, $-(\text{CH}_2)_2-$), 2.83 (s, 3H, CH_3), 3.28 (bs, 2H, CH_2), 3.41-3.55 (m, 6H, aliph. und azepinische CH_2 -Gruppe), 3.71-3.73 (m, 2H, CH_2), 3.78-3.81 (m, 2H, CH_2) (Die Signale von 3.28 bis 3.81 sind zum Teil überlagert), 4.21-4.23 (m, 2H, CH_2), 7.27-7.29 (m, 2H, arom. H), 7.41 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, arom. H), 7.53-7.64 (m, 4H, arom. H), 7.66-7.69 (m, 2H, arom. H), 7.99 (s, 1H, Pyrido-H), 8.17-8.22 (m, 2H, arom. H), 8.35 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, arom. H), 10.42 (s, 1H, Lactam NH) 12.11 (bs, 2H, N^+H); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 40.4 (CH_3), 19.9, 25.7, 35.4 (Azepin- CH_2), 48.0, 52.1, 63.7, 68.1 (CH_2), 113.8 119.8, 121.5, 123.9, 126.8, 128.0, 128.4, 128.5 (2x), 129.7 (2x), 129.9, 130.9, (tert. C), 121.8, 125.3, 131.0, 131.7, 137.4, 137.6, 149.4, 152.8, 154.0, 154.6, 171.2 (quart. C); HPLC: 98.1 % bei 254 nm und 97.7 % bei 280 nm, $t_s = 6.000$ min, $t_m = 1.039$ min (ACN/ $\text{H}_2\text{O} + (\text{Et}_3\text{NH})_2\text{SO}_4$ 20:80), Lambda max: 255 nm; $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_2$ [640.05]; MS (HR-ESI): ber. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 567.2527$, gef. $[\text{M} + \text{H}]^+ = 567.2529$.

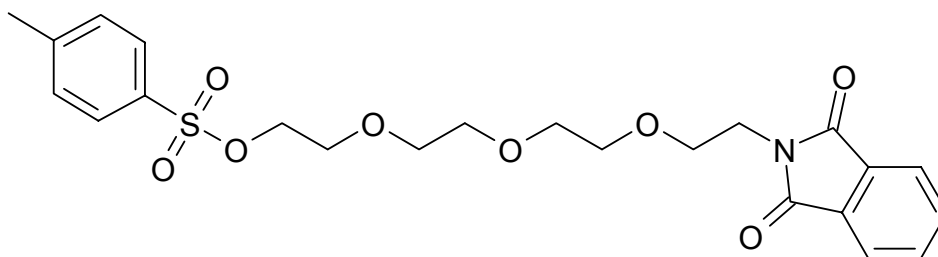
1-(4-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]-benzazepin-9-yl]oxy}butyl)-4-methylpiperazindihydrochlorid (52c)



Nach AAV 12 aus 137 mg (0.25 mmol) 9-(4-Brombutoxy)-2-(3-chlorphenyl)-4-phenyl-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**48c**) und 55 mg (0.55 mmol) *N*-Methylpiperazin.

Gelbes, amorphes Pulver, Ausbeute: 125 mg (78%); Schmp.: 225°C (Zersetzung); IR (KBr): 3423 cm⁻¹ (NH), 2947 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1668 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.81.-1.96 (m, 4H, -(CH₂)₂-), 2.83 (s, 3H, CH₃), 3.00-3.09 (m, 2H, CH₂), 3.13-3.19 (m, 2H, CH₂), 3.41-3.44 (m, 2H, CH₂), 3.82-3.87 (m, 2H, CH₂), 3.93-3.97 (m, 2H, CH₂), 4.09-4.12 (m, 2H, CH₂), 6.81 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, arom. H), 7.01 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.5 Hz, arom. H), 7.51-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.99 (s, 1H, Pyrido-H), 8.15 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, arom. H), 8.21 (ddd, 1H, *J* = 7.1/1.8/1.5 Hz, arom. H), 8.30 (s, 1H, arom. H), 10.39 (s, 1H, NH des Lactams), 11.93 (bs, 2H, N⁺H) (Das stark verbreiterte Signal der Azepin-CH₂-Gruppe ist aufgrund von Überlagerungen nicht sichtbar); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 33.81 (CH₃), 19.7, 25.8, 35.7 (Azepin-CH₂) 50.9, 55.5, 63.1 67.1 (CH₂), 105.8, 111.1, 120.1, 125.4, 126.4, 128.5 (2x), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 132.5 (tert. C.), 123.7, 125.2, 133.7, 137.6, 138.7, 140.5, 149.5, 152.7, 154.2, 159.7, 170.8 (quart. C); HPLC: 95.7 % bei 254 nm und 95.7 % bei 280 nm, *t*_s = 4.633 min, *t*_m = 1.027 min (ACN/H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 30:70), Lambda max: 255 nm; C₃₄H₃₇Cl₃N₄O₂ [640.05]; HRMS (ESI): ber. [M + H]⁺ = 567.2527, gef. [M + H]⁺ = 567.2532.

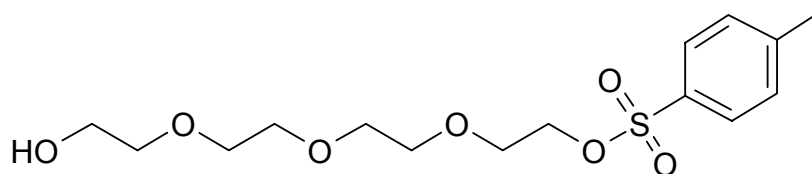
2-(2-{2-[2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat (**53**)



Zu einer eisgekühlten Lösung von 54 mg (0.44 mmol) DMAP (4-Dimethylaminopyridin), 0.725 g (7.18 mol) Triethylamin und 2.22 g (6.87 mmol) 2-(2-{2-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol (**56**) in 40 ml Dichlormethan wird portionsweise 1.37 g (7.2 mmol) 4-Methylbenzensulfonylchlorid hinzugegeben und unter Eiskühlung für 8 h gerührt. Im Anschluss wird 10 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Der Ansatz wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird mit zwei Mal mit 15 ml 1 M Salzsäure und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird nochmals im Vakuum eingeeengt und das resultierende Öl säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Gradienteneluent von Petrolether/Ethylacetat 1:1 zu reinem Ethylacetat).

Farbloses Öl, Ausbeute 1.93 g (59 %); IR (NaCl): 2871 cm^{-1} (CH, aliph.), 1773 und 1711 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH₃), 3.35-3.36 (m, 4H, OCH₂), 3.40-3.43 (m, 2H, OCH₂), 3.48-3.53 (m, 4H, OCH₂), 3.60-3.63 (m, 2H, OCH₂), 3.73-3.76 (m, 2H, NCH₂), 4.08-4.10 (m, 2H, SO₃CH₂), 7.47 ("d", 2H, J = 8.3 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.78 ("d", 2H, J = 8.3 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.82-7.88 (m, 4H, H arom. des Phthalimids); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 21.0 (CH₃), 37.1, 66.9, 67.8, 69.4, 69.6 (3 Signale überlagert), 69.9, (CH₂), 123.0 (2x), 127.6 (2x), 130.1 (2x), 134.4 (2x) (tert. C), 131.5, 132.4, 144.8, 167.7 (quart. C); C₂₃H₂₇NO₈S [477.54].

Die ^1H -NMR-spektroskopischen Signale entsprechen den in der Literatur aufgeführten Daten.⁵⁹

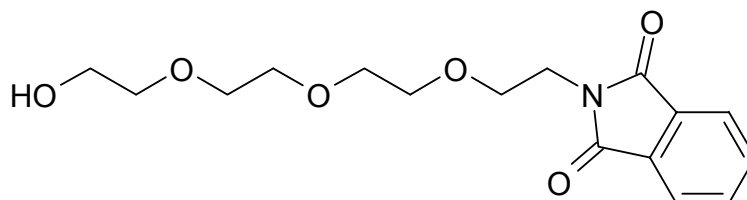
Tetraethylenglycol Monotosylat (55)

Zu einer eisgekühlten Lösung von 200 mg (1.638 mmol) DMAP (4-Dimethylaminopyridin), 4.6 g (44 mmol) Triethylamin und 80.0 g (412 mmol) Tetraethylenglycol (**54**) in 200 ml Dichlormethan wird portionsweise 15.25 g (80 mmol) 4-Methybenzensulfonylchlorid hinzu gegeben und unter Eiskühlung 8 h gerührt. Im Anschluss wird 10 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Der Ansatz wird zwei Mal mit 40 ml 1 M Salzsäure und anschließend einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Gradienteneluent von Petrolether-Ethylacetat 7:3 zu reinem Ethylacetat).

Farbloses Öl, Ausbeute 14.2 g (51 %); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.42 (s, 3H, CH_3), 3.39-3.42 (m, 2H, OCH_2), 3.44-3.50 (m, 10 H, OCH_2), 3.57-3.59 (m, 2H, OCH_2), 4.13-4.15 (m, 2H, OCH_2), 4.55 (bs, 1H, OH), 7.48 ("d", 2H, $J = 8.3$ Hz, arom.H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.79 ("d", 2H, $J = 8.3$ Hz, arom.H, Teil des AA'XX'-Systems); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 21.0 (CH_3), 60.2, 67.8, 69.61, 69.67, 69.70, 69.8, 69.9, 72.3 (CH_2), 127.6 (2x), 130.1 (2x) (tert. C), 132.4, 144.8 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{S}$ [348.42].

Die NMR-spektroskopischen Signale entsprechen den in der Literatur aufgeführten Daten.⁵⁹

2-(2-{2-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (56)

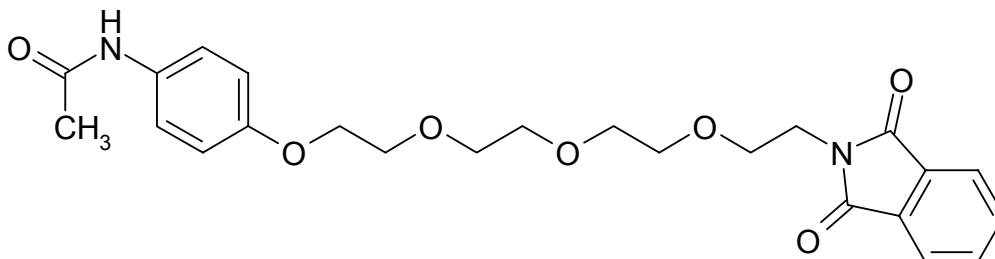


Eine Suspension von 4.12 g (11.8 mmol) Tetraethylenglycol Monotosylat (**55**) und 2.25 g (12.2 mmol) Phthalimid-Kalium (**42**) werden in 35 ml trockenem DMF bei 100°C für 8 h gerührt. Der Ansatz wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird mit zweimal 15 ml 1 M Salzsäure und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird nochmals eingeeengt und das Öl säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Gradienteneluent von Petrolether/Ethylacetat 1:1 zu reinem Ethylacetat).

Gelbliches Öl, Ausbeute 2.27 g (59%); $^1\text{H-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.35-3.48 (m, 10H, OCH₂), 3.50-3.53 (m, 2H, OCH₂), 3.61-3.64 (m, 2H, OCH₂), 3.74-3.77 (m, 2H, NCH₂), 4.54 (t, 1H, J = 5.5 Hz, OH), 7.83-7.89 (m, 4H, arom. H des Phthalimidkerns); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 37.1, 60.1, 66.9, 69.43, 69.59, 69.64, 69.74, 72.3 (CH₂), 123.0 (2x), 134.4 (2x), (tert. C), 131.5, 167.7 (quart. C); C₁₆H₂₁NO₆ [323.35].

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Signale entsprechen den in der Literatur aufgeführten Daten.⁵⁹

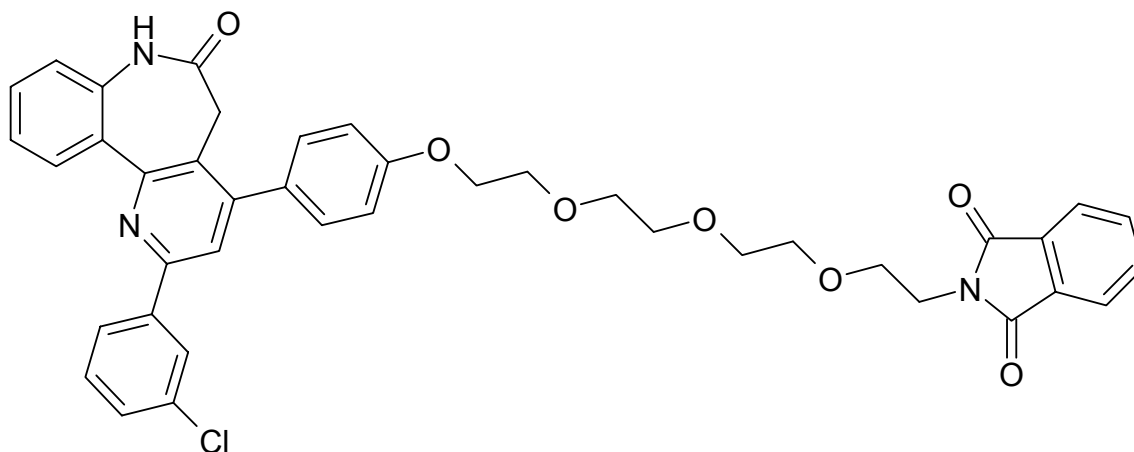
N-(4-[2-(2-[2-(2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)ethoxy]ethoxy)ethoxy)ethoxy]phenyl)acetamid (**57**)



Gemäß AAV 13 aus 151 mg (1 mmol) Paracetamol (**39**) und 477 mg (1 mmol) 2-(2-[2-(2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)ethoxy]ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat (**53**) in Acetonitril 2 h zum Rückfluss.

Farbloses Öl, Ausbeute 271 mg (59%); IR (NaCl): 3310 cm^{-1} (NH), 2874 cm^{-1} (CH, aliph.), 1713 und 1772 cm^{-1} (Phthalimid); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.00 (s, 3H, CH_3), 3.43-3.52 (m, 8H, CH_2), 3.61-3.67 (m, 4H, CH_2), 3.73-3.76 (m, 2H, CH_2), 3.98-4.00 (m, 2H, CH_2), 6.85 ("d", 2H, $J = 9.1$ Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-System), 7.45 ("d", 2H, $J = 9.1$ Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-System), 7.82-7.92 (m, 4H, arom. H des Phthalimids), 9.75 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.7 (CH_3), 37.0, 66.9, 67.1, 68.9, 69.4, 69.6, 69.7, 69.8, (CH_2), 114.3 (2x), 120.4 (2x), 123.0 (2x), 134.4 (2x) (tert. C), 131.5 (2x), 132.6, 154.1, 167.6, 167.7 (2x) (quart. C); $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7$ [456.49]; Die Substanz wird nicht weiter aufgereinigt.

2-(2-{2-[2-(2-{4-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}ethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (58a)

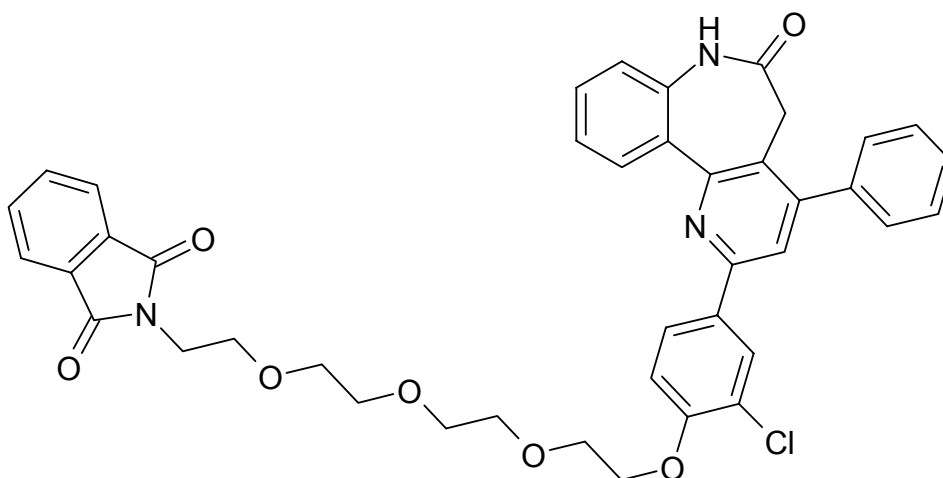


Nach AAV 13 aus 206 mg (0.5 mmol) 2-(3-Chlorphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**32a**), 138 mg (1.0 mmol) Kaliumcarbonat und 286 mg (0.6 mmol) 2-(2-{2-[2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat (**53**). In Acetonitril 4 h zum Rückfluss erhitzen. Die Substanz wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Weißes Pulver, Ausbeute 231 mg (64 %); Schmp: 124°C; IR (KBr): 2867 cm⁻¹ (CH, aliph.), 1710 und 1772 cm⁻¹ (Phthalimid), 1677 cm⁻¹ (Amid); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.35-3.85 (b, 2H, Azepin CH₂), 3.47-3.54 (m, 8H, CH₂), 3.62-3.65 (m, 2H, CH₂), 3.74-3.77 (m, 4H, CH₂), 4.16-4.19 (m, 2H, CH₂), 7.14 ("d", 2H, *J* = 8.6 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.26 ("d", 1H, *J* = 8.1 arom. H), 7.38 (dd, 1H, *J* = 8.1/7.1/1.0, arom. H), 7.50-7.56 (m, 3H, arom. H), 7.64 ("d", 2H, *J* = 8.8 Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.81-7.87 (m, 4H, arom. H des Phthalimidkerns), 8.00 (s, 1H, Pyrido H), 8.18-8.23 (m, 2H, arom. H), 8.30 ("s", 1H, arom. H) 10.43 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.4 (Azepin-CH₂), 37.1, 66.9, 67.3, 68.8, 69.43, 69.62, 69.75, 69.82 (CH₂), 114.5 (2x), 120.6, 121.5, 123.0 (2x), 123.9, 125.4, 126.4,

128.9, 129.9, 130.6, 131.1, 131.1 (2x), 134.4 (2x), (tert. C), 126.1, 129.6, 130.9, 131.5 (2x), 133.7, 137.4, 140.5, 149.1, 152.8, 154.2, 158.8, 167.7 (2x), 171.2 (quart. C); $C_{41}H_{36}ClN_3O_7$ [718.20]; ber. C 68.57, H 5.05, N 5.85; gef. C 68.51, H 5.23, N 5.70.

2-{2-[2-(2-{2-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)]phenoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl}-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (58b)

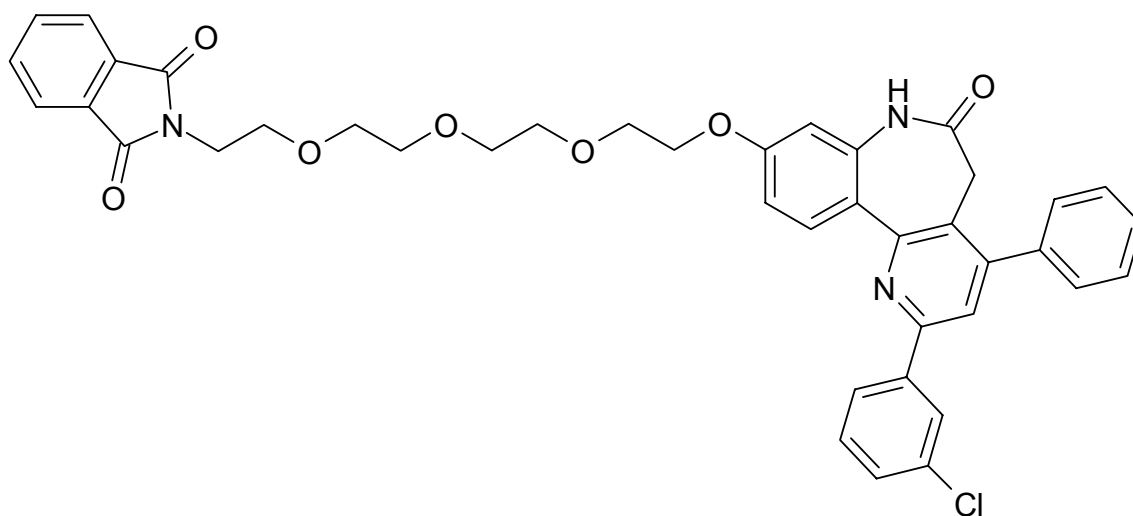


Nach AAV 13 aus 206 mg (0.5 mmol) 2-(3-Chlorphenyl-4-hydroxy)-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**32b**), 138 mg (1.0 mmol) Kaliumcarbonat und 286 mg (0.6 mmol) 2-(2-{2-[2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat (**53**). In Acetonitril 2 h zum Rückfluss erhitzen. Die Substanz wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Farbloses, amorphes Pulver, Ausbeute 310 mg (86 %); Schmp.: 126 °C; IR (KBr): 2864 cm^{-1} (CH, aliph.), 1773 und 1714 cm^{-1} (Phthalimid), 1685 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.85-4.65 (b, 2H, azepinische CH₂-Gruppe), 3.45-3.56 (m, 8H, CH₂), 3.58-3.64 (m, 2H, CH₂), 3.69-3.79 (m, 4H, CH₂), 4.18-4.26 (m, 2H, CH₂), 7.22-7.27 (m, 2H, arom. H), 7.38 ("dt", 1 H, $J = 8.3/7.8/1.0\text{ Hz}$, arom. H), 7.52-7.61 (m, 4H, arom. H), 7.66-

7.68 (m, 2H, arom. H), 7.78-7.85 (m, 4H, arom. H des Phthalimidkerns), 7.95 (s, 1H, Pyrido H), 8.15-8.19 (m, 2H, arom. H), 8.32 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, arom. H) 10.41 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.1 (Azepin CH_2), 36.8, 66.6, 68.3, 68.4, 69.2, 69.4, 69.5, 69.8 (CH_2), 113.6, 119.5, 121.2, 122.7 (2x), 123.6, 126.4, 127.8, 128.1, 128.2 (2x), 129.4 (2x), 129.6, 130.8, 134.1 (2x) (tert. C), 121.8, 125.2, 130.9, 131.5 (2x), 131.7, 137.4, 137.6, 149.3, 152.8, 154.0, 154.7, 167.7, 171.2 (2x) (quart. C); $\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_7$ [718.20]; ber. C 68.57, H 5.05, N 5.85; gef. C 68.58, H 5.26, N 5.73.

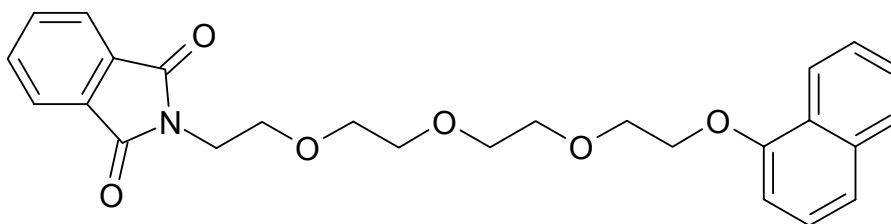
2-(2-{2-[2-(2-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-9-yl]oxy}ethoxy}ethoxy}ethyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (58c)



Nach AAV 13 aus 288 mg (0.7 mmol) 2-(3-Chlorphenyl)-9-hydroxy-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6-on (**32b**), 193 mg (1.4 mmol) Kaliumcarbonat und 401 mg (0.84 mmol) 2-(2-{2-[2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat (**53**). In Acetonitril 3 h zum Rückfluss erhitzen. Die Substanz wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Farbloses, amorphes Pulver, Ausbeute 258 mg (51 %); Schmp.: 131.5 °C; IR (KBr): 2888 cm^{-1} (CH, aliph.), 1774 und 1717 cm^{-1} (Phthalimid), 1686 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.25-3.45 (b, 2H, azepinische CH_2 -Gruppe), 3.47-3.53 (m, 8H, CH_2), 3.61-3.64 (m, 2H, CH_2), 3.73-3.76 (m, 4H, CH_2), 4.14-4.16 (m, 2H, CH_2), 6.78 (d, 1H, J = 2.5 Hz, arom. H), 6.99 (dd, 1H, J = 8.8/2.5 Hz, arom. H), 7.49-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.80-7.88 (m, 4H, arom. H des Phthalimidkerns), 7.89 (s, 1H, Pyrido H), 8.12 (d, 1H, J = 8.8 Hz, arom. H), 8.21 (dt, 1H, J = 7.0/2.0/1.2 Hz, arom. H), 8.29 (s, 1H, arom. H), 10.34 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.6 (Azepin CH_2), 37.1, 66.9, 67.3, 68.7, 69.4, 69.6, 69.7, 69.8 (CH_2), 106.4, 111.0, 120.0, 123.0 (2x), 125.4, 126.4, 128.5 (2x), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 132.5, 134.4 (2x) (tert. C, ein Signal fehlt aufgrund von Überlagerungen), 123.7, 125.1, 131.5 (2x), 133.7, 137.6, 138.6, 140.5, 149.4, 152.7, 154.2, 159.7 167.7 (2x), 170.8 (quart. C); $\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_7$ [718.20]; ber. C 68.57, H 5.05, N 5.85; gef. C 68.20, H 5.20, N 5.74.

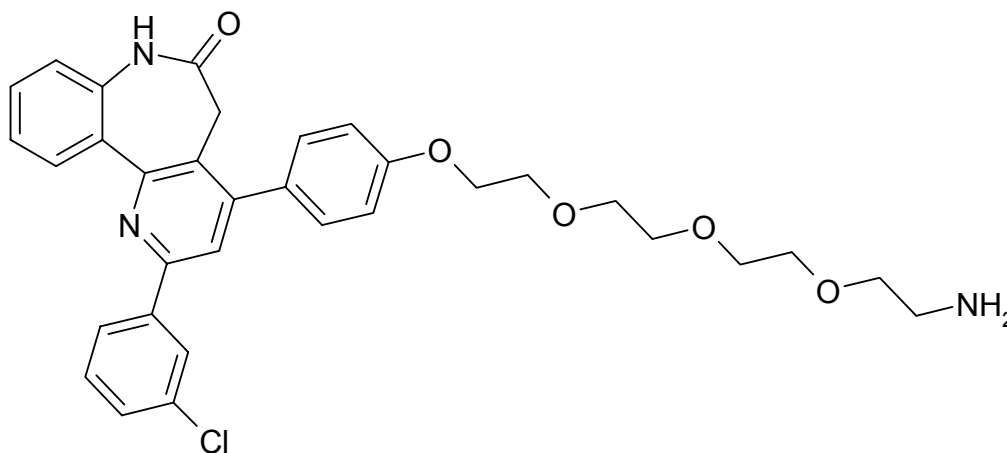
2-[2-(2-{2-[2-(1-Naphthyloxy)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (58d)



Gemäß AAV 13 aus 288 mg (2 mmol) 1-Naphtol (**60**), 1.050 g (2.2 mmol) 2-(2-{2-[2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)ethoxy]-ethoxy}ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat (**53**) und 552 mg (4 mmol) Kaliumcarbonat in 20 ml Acetonitril 6 h zum Rückfluß erhitzen.

Gelbliches Öl, Ausbeute 420 mg (46 %); IR (NaCl): 3054 cm^{-1} (CH arom.), 2871 cm^{-1} (CH aliph.), 1772 und 1711 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.46-3.52 (m, 6H, CH_2), 3.56-3.63 (m, 4H, CH_2), 3.74 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2), 3.83-3.86 (m, 2H, CH_2), 4.23-4.25 (m, 2H, CH_2), 6.95 (dd, 1H, $J = 7.6/0.8$ Hz, H arom.), 7.38-7.53 (m, 4H, H arom.), 7.79-7.86 (m, 5H, H arom. des Phthalimids überlagert mit Signal des Naphthols), 8.14-8.17 (m, 1H, H arom.); ^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 37.1, 66.9, 67.7, 69.9, 69.5, 69.6, 69.8, 70.0 (CH_2), 105.3, 119.9, 121.5, 122.9 (2x), 125.1, 126.1, 126.3, 127.4, 134.3 (2x) (tert. C), 124.9, 131.5, 134.0, 153.9, 167.7 (quart. C); MS (EI): m/z (%) = 449 $[\text{M}]^+(10)$, 174 (100), 147 (18); $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ [449.51]; ber. C: 69.47, H: 6.05, N: 3.12; gef. C: 68.79, H: 6.10, N: 3.07. Die Substanz wird ohne weitere Aufbereitung weiter verarbeitet.

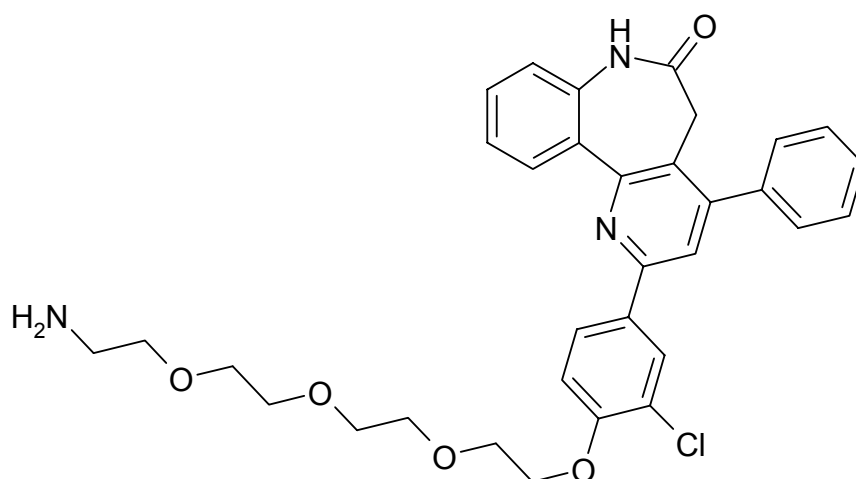
2-{2-[2-(2-{4-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}ethoxy)ethoxy]ethoxy}ethanamin (59a)



Nach AAV 14 aus 180 mg (0.25 mmol) 2-(2-{2-[2-(2-{4-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-4-yl]phenoxy}ethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol (**58a**) und 75 mg (1.5 mmol) Hydrazin-Monohydrat 1 h zum Rückfluss in Methanol erhitzen.

Weißes, amorphes Pulver, Ausbeute 72 mg (47 %); IR (NaCl): 2863 cm^{-1} (CH aliph.), 1677 cm^{-1} (C=O), 1108 (Ether); $^1\text{H-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.64-2.67 (m, 2H, CH₂), 3.35-3.38 (m, 2H, CH₂), 3.50-3.64 (m, 8H, CH₂), 3.79-3.82 (m, 2H, CH₂), 4.20-4.22 (m, 2H, CH₂), 6.97 ("d", 2H, $J = 8.8$ Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 7.25 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, arom. H), 7.37 (m, 1H, arom. H), 7.51-7.57 (m, 3H, arom. H), 7.65 ("d", 2H, $J = 8.8$ Hz, arom. H, Teil des AA'XX'-Systems), 8.01 (s, 1H, arom. H), 8.18-8.23 (m, 2H, arom. H), 8.29 ("s", 1H, arom. H), 10.40 (bs, 1H, NH) (H₂O-Signal erscheint stark verbreitert von 2.8-3.8 ppm und überlagert das Signal der azepinischen CH₂-Gruppe); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.4 (Azepin CH₂), 41.2, 67.3, 68.9, 69.6, 69.77, 69.80, 69.9, 72.8 (CH₂), 114.5 (2x), 120.6, 121.5, 123.9, 125.4, 126.4, 128.9, 129.9, 130.6, 131.1, 131.2 (2x) (tert. C), 126.2, 129.7, 130.9, 133.7, 137.4, 140.5, 149.1, 152.8, 154.3, 158.8, 171.2 (quart. C); HPLC: 99.7 % bei 254 und bei 280 nm, $t_s = 5.700$ min, $t_m = 1.027$ min (ACN/H₂O+TFA 75:25), Lambda max: 264 nm C₃₃H₃₄ClN₃O₅ × H₂O [606.12]; ber. C 65.39, H 5.99, N 6.93, gef. C 65.16, H 5.87, N 6.72.

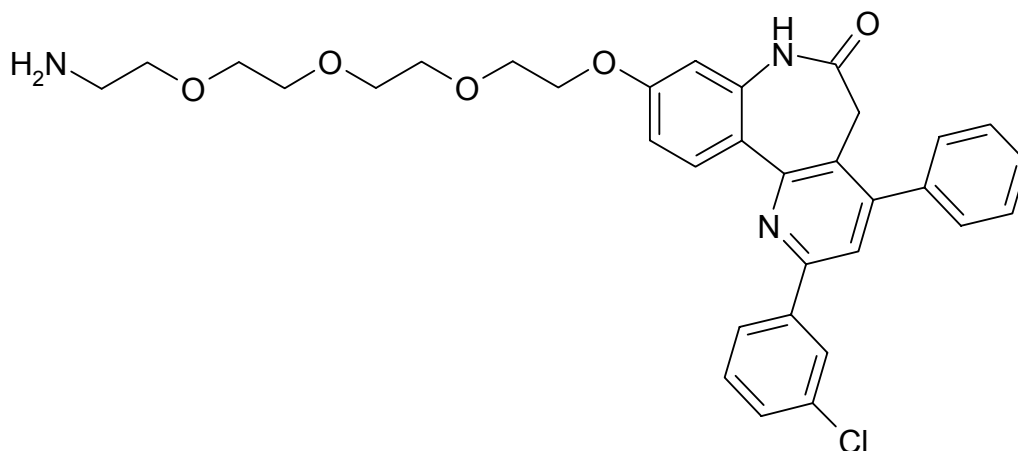
2-[2-(2-{2-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)phenoxy]ethoxy}ethoxy)ethoxy]ethanamin (59b)



Nach AAV 14 aus 310 mg (0.43 mmol) 2-{2-[2-(2-{2-[2-Chlor-4-(6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*d*][1]benz-azepin-2-yl)phenoxy]ethoxy}ethoxy)-ethoxy]ethyl}-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol (**58b**) und 130 mg (2.6 mmol) Hydrazin-Monohydrat 1 h zum Rückfluss in Methanol erhitzten.

Farbloses, amorphes Pulver, Ausbeute 136 mg (53 %); Schmp.: 136 °C; IR (KBr): 2868 cm⁻¹ (CH aliph), 1686 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.73 (t, 2H, *J* = 5.6, CH₂), 3.42 (t, 2H, *J* = 5.6, CH₂), 3.45-3.59 (m, 6H, CH₂), 3.63-3.66 (m, 2H, CH₂), 3.81-3.83 (m, 2H, CH₂), 4.25-4.28 (m, 2H, CH₂), 7.24-7.30 (m, 2H, arom. H), 7.38 ("dt", 1H, *J* = 8.1/7.0/1.0 Hz, arom. H), 7.51-7.62 (m, 4H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.98 (s, 1H, Pyrido H), 8.17-8.21 (m, 2H, arom. H), 8.32 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, arom. H), 10.38 (bs, 1H, NH) (H₂O-Signal erscheint stark verbreitert von 2.8-3.8 ppm und überlagert das Signal der azepinischen CH₂-Gruppe); ¹³C-NMR ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.4 (Azepin CH₂), 39.5, 67.8, 67.9, 68.7, 68.85, 68.92, 69.23, 70.0 (CH₂), 113.0, 118.9, 120.6, 123.1, 125.9, 127.2, 127.56, 127.62 (2x), 128.8 (2x), 129.0, 130.2 (tert. C), 121.8, 126.7, 131.1, 131.8, 137.4, 137.6, 149.4, 152.9, 154.0, 154.7, 171.2; HPLC: 97.7 % bei 254 nm, 97.6 % bei 280 nm, *t*_s = 2.720 min, *t*_m = 1.027 min (ACN/H₂O+TFA 75:25), Lambda max: 255 nm; C₃₃H₃₄ClN₃O₅ × ½ H₂O [597.11]; ber. C 66.38, H 5.91, N 7.04, gef. C 66.37, H 6.01, N 6.90.

2-{2-[2-(2-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-9-yl]oxy}ethoxy)ethoxy]ethoxy}ethanamin (**59c**)

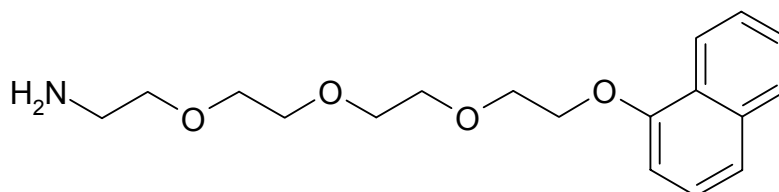


Nach AAV 14 aus 179 mg (0.25 mmol) 2-(2-{2-[2-(2-{[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-d][1]benzazepin-9-yl]oxy}ethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (**58c**) und 75 mg (1.5 mmol) Hydrazin-Monohydrat 1 h zum Rückfluss in Methanol erhitzt.

Farbloses, amorphes Pulver, Ausbeute 140 mg (93 %); Schmp.: 69 °C; IR (KBr): 2856 und 2921 cm^{-1} (CH aliph.), 1683 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.64 (t, 2H, J = 5.8 Hz, CH_2), 3.35 (t, 2H, J = 5.8 Hz, CH_2), 3.50-3.63 (m, 8H, CH_2), 3.80 (t, 2H, J = 4.6 Hz, CH_2), 4.18 (t, 2H, J = 4.6 Hz, CH_2), 6.79 (d, 1H, J = 2.5 Hz, arom. H), 7.00 (dd, 1H, J = 8.8/2.5 Hz, arom. H), 7.50-7.61 (m, 5H, arom. H), 7.66-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.99 (s, 1H, Pyrido H), 8.14 (d, 1H, J = 8.8 Hz, arom. H), 8.21 (dt, 1H, J = 6.8/1.8/1.5 Hz, arom. H), 8.29 (s, 1H, arom. H) (Das H_2O -Signal erscheint stark verbreitert von 2.8-3.8 ppm und überlagert das Signal der azepinischen CH_2 -Gruppe. Das Signal des Lactam H ist aufgrund des schnellen Protonenaustausch nicht zu detektieren); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.4 (Azepin CH_2), 41.1, 67.1, 67.3, 68.7, 69.4, 69.6, 69.7, 69.8 (CH_2), 106.4, 111.0, 120.0, 125.4, 126.4, 128.4, 128.5 (2x), 128.9, 129.7 (2x), 130.6, 133.7 (tert. C), 123.7, 125.1, 132.5, 137.6, 138.7, 140.5, 149.4, 152.7, 154.2, 159.7, 170.8 (quart. C); HPLC: 95.9 % bei 254 nm und 97.0 % bei 280 nm, t_s = 5.195 min, t_m = 1.025 min

(ACN/H₂O+TFA 75:25), Lambda max: 250 nm; C₃₃H₃₄ClN₃O₅ × H₂O [606.12]; ber. C 65.39, H 5.99, N 6.93, gef. C 65.50, H 6.02, N 6.69.

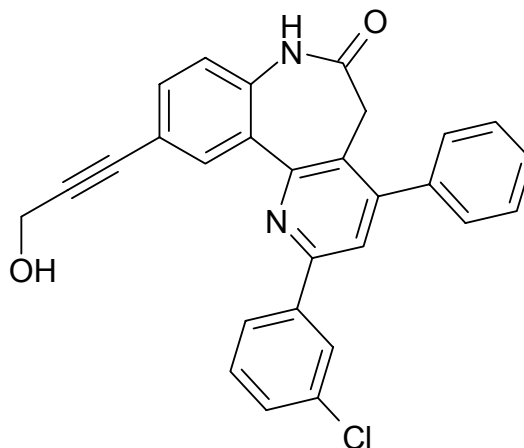
2-(2-{2-[2-(1-Naphthyloxy)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethanamin (59d)



Gemäß AAV 14 aus 368 mg (0.75 mmol) 2-[2-(2-{2-[2-(1-Naphthyl-oxy)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol (**58d**) in Acetonitril mit 225 mg (4.5 mmol) Hydrazinmonohydrat 1 h zum Rückfluss erhitzen.

Orangefarbenes Öl, Ausbeute 196 mg (80 %); IR (NaCl): 3369 cm⁻¹ (NH₂), 3052 cm⁻¹ (CH arom.), 2871 cm⁻¹ (CH aliph.), 1101 cm⁻¹ (Ether); ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.62 (t, 2H, *J* = 5,8 Hz, CH₂), 3.34 (t, 2H, *J* = 5,8 Hz, CH₂), 3.47-3.50 (m, 2H, CH₂), 3.53-3.59 (m, 4H, CH₂), 3.66-3.69 (m, 2H, CH₂), 3.89-3.91 (m, 2H, CH₂), 4.27-4.29 (m, 2H, CH₂), 6.98 (dd, 1H, *J* = 7.6/0.8 Hz, H arom.), 7.39-7.54 (m, 4H, H arom.), 7.85-7.88 (m, 1H, H arom.), 8.16-8.18 (m, 1H, H arom.), NH₂-Gruppe und Wasserpeak erscheinen als sehr breites Signal von 0.5 bis 4.5; ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 41.3, 67.7, 68.9, 69.5, 69.7, 69.8, 70.0, 73.0 (CH₂), 105.3, 120.0, 121.5, 125.1, 126.1, 126.3, 127.4 (tert. C), 124.9, 134.0, 153.9, (quart. C); MS (EI):*m/z* (%) = 319 [M]⁺(3), 144 (100); HPLC: 99.8 % bei 254 nm und 99.9 % bei 280 nm, *t*_s = 2.457, *t*_m = 1.050 (ACN/Wasser+(Et₃NH)₂SO₄), Lambda max. 265 nm; C₁₈H₂₅NO₄ × ½ H₂O [328.41]; ber. C 65.83, H 7.89, N 4.27; gef. C 65.31, H 7.96, N 4.21.

3-[2-(3-Chlorphenyl)-6-oxo-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-10-yl]prop-2-in-1-ol (71)



523 mg (1 mmol) 2-(3-Chlorphenyl)-10-iod-4-phenyl-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**35d**) werden mit 224 mg (4 mmol) Propargylalkohol (**68**), 276 mg (2 mmol) Kaliumcarbonat, 14.0 mg (20 μ mol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid und 9.5 mg (50 μ mol) Kupferiodid in DMF gelöst und unter Stickstoffbegasung langsam von Raumtemperatur auf 50 °C erhitzt. 15 min nach Erreichen der Solltemperatur lässt man den Ansatz auf Raumtemperatur abkühlen und gießt dann auf 300 ml gesättigte Natriumchloridlösung. Der entstandene feine Niederschlag wird durch eine Fritte abgesaugt und getrocknet. Die Umkristallisation erfolgt aus Toluol.

Beigefarbenes Pulver, Ausbeute 243 mg (54 %); Schmp.: 257 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3190 cm^{-1} (CH, arom.) 1665 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.42 (bs, 2H, Azepin CH_2 , überlappend mit dem Wassepeak), 4.36 (d, 2H, J = 5.8 Hz, CH_2), 5.38 (t, 1H, J = 5.8 Hz, OH), 7.26 (d, 1H, J = 8.3 Hz, arom. H), 7.53-7.62 (m, 6H, arom. H), 7.67-7.69 (m, 2H, arom. H), 8.07 (s, 1H, Pyrido H), 8.20-8.23 (m, 2H, arom. H), 8.29 ("s", 1H, arom. H), 10.58 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 35.5 (Azepin- CH_2), 49.5 (CH_2), 121.1, 122.0, 125.5, 126.5, 128.51 (2x), 128.54, 129.1, 129.7(2x), 130.7, 132.6, 133.7 (tert. C), 83.1, 89.8, 117.8, 126.1, 130.9, 133.8, 137.3, 137.4, 140.3, 149.7, 153.1, 153.4, 171.0 (quart. C); HPLC: 99.2 % bei 254 nm und

98.6 % bei 280 nm, t_s = 2.585 min, t_m = 1.045 min (ACN/H₂O 70:30);
Acetonitril/Wasser (70/30), Lambda max: 253 nm; C₂₈H₁₉CIN₂O₂ [450.93]; ber.
C 74.58, H 4.25, N 6.21; gef. C 74.27, H 4.31, N 6.46.

7.2 Versuche zu Kapitel

7.2.1 Allgemeines

7.2.1.1 Verwendete Geräte

Zentrifugen

Centrifuge 5417R, Eppendorf

Laborfuge 400R, Heraeus

Sorvall RC 11120 Ex, Du Pont

Probendenaturierung

Thermomixer comfort 5355, V 2.10, Eppendorf

pH-Meter

Basic pH Meter, Denver Instrument Company

Waagen

PJ 3600 DeltaRange (5-3100g), Mettler

PJ 150 (0.050-150g), Mettler

Schüttelapparatur

KS 250 basic, Kika Labortechnik

Vakuumtrockner für Gele

Gel Dryer Model 583, Bio-Rad

Elektrophorese-Kammer

EPS 2A 200, Hoefer Scientific Instruments

Spannungsquelle

XCell SureLock™ MiniCell, Invitrogen

7.2.1.2 Materialien

Aktivierte Trägermaterialien

Affigel® 10, Bio-Rad

Affigel® 15, Bio-Rad

Cyanbromid-aktivierte Sepharose® 4B, Sigma-Aldrich

Reacti-Gel® (6x), Pierce

Molekularmassenstandards

See Blue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen

Gele

NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel, 1 mm; 10 und 12 Wells, Invitrogen

Reagenzien und Fertiglösungen

ATP Dinatriumsalz, Grade I, 99%, Sigma

Bradford Essay Kit, BioRad

Dinatriumphosphat Dihydrat, ≥95%, Sigma

DMSO (= Dimethylsulfoxid), für Molekular Biologie, >99.9 %, Sigma

DMF (= Dimethylformamid), für Molekular Biologie, >99 %, Sigma

DTT (= Dithiothreitol), SigmaUltra, >99% (Titration), Sigma-Aldrich

EDTA (= Ethylendiaminetetraessigsäure) Dinatriumsalz Dihydrat, 99%, Sigma

EGTA (= Ethylenglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure), für Molekular Biologie, ≥97 %, Sigma-Aldrich

Ethanolamin, Redestilliert, >99.5 %, Aldrich

MOPS (= 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure), ≥99.5% (Titration), Sigma

Natriumacetat, wasserfrei, ≥99.0%, Sigma-Aldrich

Natriumhydrogencarbonat, ACS Reagenz, Sigma-Aldrich

Natriumchlorid, > 99.0 %, ACS Reagenz, Sigma-Aldrich

Natriumfluorid, > 99.0 %, ACS Reagenz, Sigma-Aldrich

Natriumvanadat, purum, ≥98.0 %, Fluka

Nonidet® P 40, ~10% in H₂O, BioChemika, Fluka

NuPAGE Antioxidant, Invitrogen

NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), Invitrogen

NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (für Bis-Tris Gele) (20X), Invitrogen

NuPAGE Sample Reducing Agent (10X), Invitrogen

PlusOne™ Silver Staining, GE Healthcare

Salzsäure, ACS Reagenz, 37%, Sigma-Aldrich

Triethylamin, ≥99%, Sigma-Aldrich

Trizma® Base (= Tris(hydroxymethyl)aminomethan), 99,9 %, Sigma

7.2.1.3 Lösungen

Kupplungspuffer

20 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0.5 M) und 4 ml Natriumchlorid-Lösung (5 M) werden mit Aqua dem. ad 75 ml ergänzt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8.3 eingestellt.

Waschpuffer

20 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0.5 M) und 4 ml Natriumchlorid-Lösung (5 M) werden mit Aqua dem. ad 100 ml ergänzt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8.3 eingestellt.

Immobilisierungslösung

0.05 mmol der zu immobilisierenden Aminoverbindung werden in 0.5 ml DMSO gelöst. 100 µl der erhaltenen Lösung werden mit 900 µl DMSO zu einer 0.01 M Stammlösung verdünnt. 50 µl dieser Stammlösung werden mit 2.5 ml DMF gemischt und unter Rühren 7.5 ml Kupplungspufferlösung langsam hinzugetropt.

Ethanolaminlösung für Affigele

6.108 g Ethanolamin werden mit DMSO ad 100 ml ergänzt.

Ethanolaminlösung für Cyanbromid-aktivierte Sepharose

12.22 g Ethanolamin werden mit Aqua dem. ad 200 ml ergänzt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8.0 eingestellt.

Acetatpuffer (pH 4)

2.05 g Natriumacetat werden in 250 ml Aqua dem. gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 4.0 eingestellt.

Matrix-Puffer (pH 7.4)

6.057 Trizma[®] Base, 0.210 g Natriumfluorid, 14.6 g Natriumchlorid, 1.86 g EDTA, 1.928 g EGTA und 1 ml Nonidet[®] P 40 werden mit Aqua dem. ad 1 l ergänzt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7.4 eingestellt. Zu der eingestellten Lösung werden 1 ml Leupeptin (10 mg/ml), 1 ml Aprotinin (10 mg/ml), 1 ml Sojabohnen Trypsin-Inhibitor (10 mg/ml) und 1 ml Benzamidin (100 mg/ml) gegeben. Die fertige Lösung wird bei 4 °C gelagert.

Homogenisierungs-Puffer

12.96 g β -Glycerolphosphat, 5.567 g Nitrophenylphosphat, 5.780 g MOPS, 5.706 g EGTA, 1.429 g Magnesiumchlorid, 0.154 g DTT, 0.184 g Natriumvanadat, 0.042 Natriumfluorid und 0.254 g Dinatriumphosphat Dihydrat werden mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7.2 eingestellt. Zu der eingestellten Lösung werden 1 ml Leupeptin (10 mg/ml), 1 ml Aprotinin (10 mg/ml), 1 ml Sojabohnen Trypsin-Inhibitor (10 mg/ml) und 1 ml Benzamidin (100 mg/ml) gegeben. Die fertige Lösung wird bei 4 °C gelagert.

Laemmli-Puffer

100 μ l NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) werden mit 250 μ l NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) mit Aqua dem. zu 500 μ l ergänzt.

Anodenlösung (für SDS-PAGE)

40 ml NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (für Bis-Tris Gele) (20X) werden mit Aqua dem. ad 800 ml ergänzt.

Kathodenlösung (für SDS-PAGE)

200 ml Anodenlösung werden mit 500 μ l NuPAGE Antioxidant gemischt.

Lösungen für die Silberfärbung

Fixierlösung:	100 ml Ethanol, 25 ml Essigsäure, Aqua dem. ad 250 ml
Inkubationslösung:	75 ml Ethanol, 10 ml Natriumthiosulfat-Lösung (5 %), 17.0 g Natriumacetat, 1.25 ml Glutardialdehyd (25 %), Aqua dem. ad 250 ml
Silberfärbelösung:	100 µl Formaldehydlösung (37%), 25 ml Silbernitratlösung (2.5 %), Aqua dem. ad 250 ml
Entwicklerlösung:	6.25 g Natriumcarbonat, 50 µl Formaldehydlösung (37%), Aqua dem. ad 250 ml
Stopplösung:	2.65 g EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat), Aqua dem. ad 250 ml

Blaufärbung

Bio-Safe™ Coomassie Stain, Bio-Rad

Essigsäure 10%

7.2.1.4 Biologisches Material

Die für die Affinitätsuntersuchungen verwendeten biologischen Materialien wurden von der Arbeitsgruppe Meijer, Station Biologique de Roscoff, Frankreich, nach publizierten Methoden gewonnen und für die Durchführung der Testungen zur Verfügung gestellt.⁵⁶

7.2.2 Methoden

AAV 17: Immobilisierung von Darponen an Affigele (3 oder 5 μ M/ml Matrix)

Für 500 μ l aktiviertes Trägermaterial wird 1.0 ml Affigel-Suspension 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Bei abweichendem Volumen des Zentrifugats vom Sollwert wird Trägermaterial-Suspension ergänzt, bzw. entnommen, bis die gewünschte Menge nach wiederholter Prozedur vorliegt. Der Rückstand wird viermal mit 5 ml DMSO gewaschen und das Zentrifugat mit 150 bzw. 250 μ l einer 0.01 M DMSO-Lösung der zu immobilisierenden Aminobutoxydarponverbindung, 10 μ l Triethylamin und 5.0 ml DMSO versetzt. Nach Schütteln über Nacht wird zentrifugiert, der Rückstand mit 10 ml Ethanolaminlösung für Affigele versetzt und abermals geschüttelt. Nach 3 h wird zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zentrifugat wird erst mit 5 ml DMSO und anschließend viermal mit Matrix-Puffer gewaschen. Die erhaltene Matrix wird als 20 %ige Suspension in Matrix-Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

AAV 18: Immobilisierung an Cyanbromid-aktivierte Sepharose (1 μ M/ml Matrix)

Für 500 μ l aktiviertes Trägermaterial wird ca. 0.2 g Cyanbromid-aktivierte Sepharose mit 2 ml 1 mM Salzsäure 15 min quellen gelassen. Es wird viermal mit 10 ml 1 mM Salzsäure gewaschen. Bei abweichendem Volumen des Zentrifugats vom Sollwert wird Trägermaterial-Suspension ergänzt, bzw. entnommen, bis die gewünschte Menge nach wiederholter Prozedur vorliegt. Anschließend wird zweimal mit 10 ml Waschpufferlösung gewaschen, der Überstand verworfen und das Trägermaterial mit 10 ml der Immobilisierungslösung der zu immobilisierenden Aminoverbindung versetzt. Die Suspension wird über Nacht geschüttelt und nach Beendigung der Kupplungsreaktion zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zentrifugat mit 10 ml Ethanolaminlösung für Cyanbromid-aktivierte Sepharose versetzt und geschüttelt. Nach 2 h wird abermals bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Der Rückstand wird zweimal abwechselnd mit Acetatpuffer pH 4 und Waschpufferlösung und danach dreimal mit Matrix-Puffer gewaschen. Die Matrix wird als 20 %ige Suspension in Matrix-Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

AAV 19: Herstellung von Gewebe- und Zellehomogenaten

Die verschiedenen Gewebe werden in Homogenisierungs-Puffer suspendiert (ca. 1g biologisches Material auf 2 ml), homogenisiert und mit einer Ultraschallsonde behandelt. Im Anschluss wird die Suspension für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bei 100000 rpm für 1 h zentrifugiert. Zellen werden analog der Aufarbeitung der Gewebe behandelt, wobei der Schritt der Homogenisierung entfällt. Die Proben werden bei -78 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut.

AAV 20: Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der hergestellten Gewebe- und Zellehomogenate erfolgte mit Hilfe des Bradford Essay Kits (BioRad).¹⁵⁶

AAV 21: Inkubation der Matrices mit Gewebe- und Zellhomogenaten

40 µl der jeweiligen Matrix-Suspension (entspricht 10 µl Matrix) werden mit 1 ml Matrix-Puffer gewaschen und anschließend in 0.6 ml Matrix-Puffer suspendiert. Die Zugabe des Extraktvolumens richtet nach der jeweiligen Proteinkonzentration und wird so berechnet, dass die Proteinmenge 1 bis 3 mg/10 µl Matrix entspricht. Die Inkubation erfolgt im sofortigen Anschluss der Extraktzugabe bei 4 °C unter Schütteln über einen Zeitraum von 30 min. Die Proben werden im Anschluss viermal mit Matrix-Puffer gewaschen und mit 50 µl Laemmli-Puffer versetzt. Nach 3 minütiger Denaturierung bei 100 °C im Heizblock wird die Suspension zunächst gründlich geschüttelt und dann bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird die Gelelektrophorese verwendet. Die Proben lassen sich bei -20 °C für spätere Untersuchungen aufbewahren.

AAV 22: SDS-Page

Für die Trennung der an die Matrix gebundenen Proteine werden NuPAGE Fertiggelplatten der Firma Invitrogen verwendet. Hierzu werden zunächst

Schutzstreifen und Schutzkamm der Platte entfernt, welche anschließend in die Elektrophorese-Kammer eingespannt wird. Anodenlösung und Kathodenlösung werden gemäß Anleitung eingefüllt und die Geltaschen gründlich mit der Kathodenlösung gespült. Die aus AAV 20 erhaltenen Proben werden nach der Zentrifugation (14000 rpm/ 4 °C) mit Hilfe einer Mikroliterspritze in die Geltaschen überführt. Die Menge der aufzutragenden Probenlösung und des Molekularmassenstandards ist dabei abhängig von der darauf folgenden Detektionsmethode. Für die Silberfärbung sind 20-30 µl Probenlösung und 5 µl Molekularmarker ausreichend, während für die Entwicklung nach Coomassie mit anschließender Isolierung von Proteinbanden bis zu 50 µl Probenlösung verwendet werden, bei einem Molekularmarkervolumen von 10 µl. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 200 Volt über einen Zeitraum von 40 bis 60 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel von der Plastikummantelung befreit und kann nun mittels Silberfärbung (AAV 22) bzw. Commassi-Färbung (AAV 23) entwickelt werden.

AAV 23: Silberfärbung

Alle für die Silberfärbung unter 7.1.3.3 aufgeführten Lösungen sind stets frisch herzustellen. Das zu färbende Gel wird für 30 min in einem Bad mit der Fixierlösung geschwenkt. Diese wird anschließend verworfen und das Gel mit der Inkubationslösung für weitere 30 min behandelt. Nach Abtrennen der Inkubationslösung wird drei Mal jeweils 5 min mit Aqua dem. gewaschen. Das Gel wird vorsichtig mit der Silberfärbelösung überschichtet und 20 min geschwenkt. Die Lösung wird im Anschluss entsorgt und das Gel zweimal mit Aqua dem. für 1 min gewaschen. Danach wird das Gel mit der Entwicklerlösung versetzt und die Farbentwicklung der Proteinbanden beobachtet. Wenn die Proteinbanden die gewünschte Farbintensität erreicht haben (2-5 min), wird die Entwicklerlösung verworfen und die Farbentwicklung durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen. Das Gel wird gründlich mit Aqua dem. gewaschen und unter Vakuum bei 65 °C 1.5 h lang getrocknet.

AAV 24: Isolation von Proteinbanden für die Mikrosequenzanalyse

Die Proteinbanden für die Mikrosequenzanalyse werden unter keratinfreien Bedingungen aus dem Coomassie-Gel isoliert. Das zu färbende Gel wird dreimal mit Aqua dem. gewaschen und danach mit 50 ml Blaufärbelösung für 1 h geschwenkt. Anschließend wird das Gel gründlich mit Aqua dem. gewaschen und zur Entfernung überschüssiger Färbung 12 h in verdünnter Essigsäure gelagert. Die visualisierbaren Banden werden kontaminationsfrei mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten und die erhaltenen Proben bis zum Versand in 10%iger Essigsäure bei -20 °C gelagert.

AAV 25: Hemmtest mit nicht immobilisierten Darponen

Das Zell- oder Gewebehomogenat wird mit Matrixpuffer zu einem Volumen von 1 ml ergänzt. Die Menge des Homogenates wird dabei so berechnet, dass die Endkonzentration an Protein 1 mg/ml entspricht. Zu dieser Lösung werden 10 µl einer 10 mM DMSO-Lösungen der Darpon-Leitstruktur **2B**, dem inaktiven *N*-Methyldarpon **Kun68** oder dem Aminobutoxydarpon **50b** gegeben (Die Verbindungen **2B** und **Kun68** wurden für die Experimente von C. Kunick zur Verfügung gestellt). Die so behandelten Homogenate werden gemäß AAV 21 mit einer Matrix der jeweils gleichen Anbindungsstelle inkubiert. Als Vergleich in der SDS-PAGE dient eine unbehandelte, inkubierte Probe gleicher Proteinkonzentration.

AAV 26: Hemmtest mit ATP

Das Zell- oder Gewebehomogenat wird mit Matrixpuffer zu einem Volumen von 900 µl ergänzt und 100 µl einer 0.1 M ATP Lösung dazu gegeben. Das Volumen des Homogenates wird dabei so berechnet, dass die Endkonzentration an Protein 1 mg/ml beträgt. Das so behandelte Homogenat wird im Anschluß gemäß AAV 21 inkubiert und als Vergleich eine unbehandelte, inkubierte Probe gleicher Proteinkonzentration bei der SDS-PAGE aufgetragen.

AAV 27: Affinitätsuntersuchungen nach Vorinkubation mit Darponmatrix

Das Zell- oder Gewebehomogenat wird mit Darponmatrix für 30 min bei 4° C inkubiert. Im Anschluss wird die Probe 3 min zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C) und der erhaltene Überstand auf eine äquivalente Menge Matrix gleicher Ligandenanbindungsstelle gegeben. Diese Probe wird gemäß AAV 21 erneut inkubiert und entsprechend weiter behandelt. Das Zentrifugat, welches nach der 1. Inkubation erhalten wurde, wird ebenfalls nach AAV 21 aufgearbeitet und dient in der SDS-PAGE als Vergleich zur Probe mit Vorinkubation.

8 Anhang

8.1 Daten der COMPARE-Analyse aus Kapitel 2

Tab. 8-1: Matrix nach Eliminierung der „atypischen“ Darpone. Cluster der besten 15 Darpone, geordnet nach mittleren Korrelationen.

Verbindung	2N	2B	2A	2i	2a	2j	2q	2r	2c	2b	2o	2e	2h	2k	2D
2N		0,547	0,550	0,516	0,52	0,664	0,602	0,576	0,664	0,544	0,503	0,686	0,664	0,583	0,678
2B	0,547		0,577	0,577	0,440	0,533	0,620	0,461	0,745	0,701	0,535	0,651	0,661	0,776	0,727
2A	0,550	0,577		0,519	0,58	0,643	0,616	0,670	0,588	0,702	0,753	0,546	0,646	0,639	0,715
2i	0,516	0,577	0,519		0,73	0,548	0,661	0,611	0,578	0,591	0,681	0,691	0,815	0,581	0,612
2a	0,517	0,440	0,58	0,727		0,573	0,657	0,724	0,556	0,640	0,769	0,672	0,630	0,627	0,600
2j	0,664	0,533	0,643	0,548	0,57		0,477	0,580	0,758	0,708	0,620	0,593	0,614	0,760	0,788
2q	0,602	0,620	0,616	0,661	0,66	0,477		0,874	0,549	0,665	0,749	0,623	0,688	0,654	0,631
2r	0,576	0,461	0,670	0,611	0,72	0,580	0,874		0,560	0,641	0,830	0,679	0,628	0,670	0,692
2c	0,664	0,745	0,588	0,578	0,56	0,758	0,549	0,560		0,643	0,620	0,722	0,610	0,797	0,816
2b	0,544	0,701	0,702	0,591	0,640	0,708	0,665	0,641	0,643		0,710	0,645	0,717	0,773	0,721
2o	0,503	0,535	0,753	0,681	0,77	0,620	0,749	0,830	0,620	0,710		0,655	0,675	0,713	0,688
2e	0,686	0,651	0,546	0,691	0,67	0,593	0,623	0,679	0,722	0,645	0,655		0,777	0,747	0,833
2h	0,664	0,661	0,646	0,815	0,630	0,614	0,688	0,628	0,610	0,717	0,675	0,777		0,668	0,738
2k	0,583	0,776	0,639	0,581	0,63	0,760	0,654	0,670	0,797	0,773	0,713	0,747	0,668		0,839
2D	0,678	0,727	0,715	0,612	0,600	0,788	0,631	0,692	0,816	0,721	0,688	0,833	0,738	0,839	
Mittelwert	0,592	0,611	0,619	0,622	0,622	0,633	0,648	0,657	0,658	0,669	0,679	0,680	0,681	0,702	0,720

Tab. 8-2: Daten der Matrix-COMPARE-Analyse

Ver- bindung	2n	2R	2U	2V	2Y	2F	2M	2S	2K	2Q	2d
2n		0,176	0,179	0,095	0,065	0,119	0,217	0,264	0,094	0,187	0,163
2R	0,176		0,375	0,310	-0,026	-0,230	0,070	-0,199	-0,292	0,238	0,521
2U	0,179	0,375		0,491	-0,129	-0,193	0,485	0,582	-0,434	-0,125	0,373
2V	0,095	0,310	0,491		0,147	-0,155	0,330	0,574	-0,174	-0,145	0,229
2Y	0,065	-0,026	-0,129	0,147		0,393	0,193	-0,007	0,068	0,018	0,013
2F	0,119	-0,230	-0,193	-0,155	0,393		0,257	-0,102	0,292	0,122	-0,191
2M	0,217	0,070	0,485	0,330	0,193	0,257		0,455	0,138	0,218	0,148
2S	0,264	-0,199	0,582	0,574	-0,007	-0,102	0,455		-0,206	0,078	0,521
2K	0,094	-0,292	-0,434	-0,174	0,068	0,292	0,138	-0,206		0,299	-0,173
2Q	0,187	0,238	-0,125	-0,145	0,018	0,122	0,218	0,078	0,299		0,305
2d	0,163	0,521	0,373	0,229	0,013	-0,191	0,148	0,521	-0,173	0,305	
2H	-0,099	0,133	0,089	0,284	0,191	-0,044	0,239	0,300	0,055	0,221	0,461
2G	0,030	-0,096	0,059	0,099	0,113	0,246	0,328	0,235	0,339	0,345	0,188
2L	0,058	0,036	0,310	0,157	0,120	0,168	0,283	0,326	0,482	0,180	0,267
2E	-0,076	0,007	0,188	0,094	0,169	0,007	0,476	0,264	0,344	0,192	0,135
2m	-0,151	0,155	0,258	-0,082	-0,128	0,034	0,146	0,183	0,105	0,445	0,263
2P	0,144	0,022	0,245	0,223	0,300	0,399	0,339	0,390	0,239	0,262	0,008
2O	0,132	0,063	0,421	0,305	0,187	0,236	0,447	0,494	0,078	0,171	0,167
2C	0,314	0,118	0,011	0,166	-0,045	0,244	0,044	0,184	0,202	0,160	0,289
2X	-0,122	0,001	-0,149	0,070	0,320	0,286	0,131	0,214	0,232	0,170	0,143
2J	-0,001	0,078	0,047	0,060	0,022	0,168	0,043	0,213	0,165	0,376	0,347
2I	-0,180	-0,058	-0,082	-0,021	0,251	0,059	0,126	0,116	0,331	0,185	0,161
2W	0,055	0,155	-0,042	0,089	0,340	0,378	0,320	0,315	0,319	0,213	0,295
2f	-0,140	-0,209	-0,347	-0,055	0,377	0,264	0,139	0,127	0,420	0,172	0,100
2I	-0,037	0,248	0,117	0,006	-0,161	-0,060	0,142	0,322	0,190	0,337	0,720
2s	0,140	0,333	0,300	0,189	0,034	-0,010	0,256	0,527	0,092	0,347	0,680
2T	-0,030	-0,054	0,059	0,015	0,219	0,332	0,215	0,306	0,216	0,260	0,190
2g	0,125	0,097	0,342	0,195	-0,059	-0,063	0,094	0,299	0,469	0,437	0,311
2B	-0,083	-0,199	-0,363	-0,170	0,367	0,455	0,146	-0,121	0,625	0,339	0,036
2a	-0,142	-0,065	0,005	-0,063	0,084	0,216	0,067	0,236	0,240	0,411	0,203
2j	-0,165	0,029	0,063	-0,006	-0,054	-0,099	0,017	0,234	0,361	0,289	0,614
2b	-0,071	-0,156	-0,422	0,233	0,002	0,253	0,023	0,018	0,599	0,466	0,142
2p	0,037	0,074	0,139	0,060	0,022	0,173	0,152	0,289	0,304	0,354	0,403
2c	-0,193	-0,078	-0,174	-0,166	0,141	0,092	0,133	0,059	0,448	0,254	0,310
2A	0,582	-0,056	-0,152	-0,153	0,025	0,247	-0,033	0,083	0,377	0,360	0,279
2N	-0,119	-0,118	0,230	0,144	0,033	0,080	0,339	0,308	0,404	0,270	0,414
2k	-0,191	-0,079	-0,149	-0,181	-0,041	0,249	-0,032	-0,030	0,475	0,325	0,314
2r	-0,128	0,060	0,025	0,005	0,005	0,064	0,073	0,387	0,271	0,354	0,382
2D	-0,151	-0,036	-0,214	-0,130	0,038	0,173	-0,042	0,050	0,509	0,361	0,292
2o	-0,090	0,011	-0,094	-0,070	0,156	0,190	-0,070	0,292	0,300	0,354	0,359
2i	-0,157	0,162	0,228	0,116	0,160	0,186	0,123	0,289	0,320	0,400	0,280
2e	-0,199	0,054	0,110	-0,009	0,098	0,181	0,165	0,218	0,341	0,371	0,334
2q	-0,005	-0,066	0,052	0,102	0,236	0,285	0,234	0,348	0,393	0,355	0,282
2h	0,089	0,228	0,314	0,149	0,052	0,059	0,086	0,536	0,400	0,522	0,542
Mittelwert	0,017	0,037	0,068	0,078	0,101	0,134	0,177	0,231	0,237	0,268	0,278

Fortsetzung Tab. 8-2:

Ver- Bindung	2H	2G	2L	2E	2m	2P	2O	2C	2X	2J	2I
2n	-0,099	0,030	0,058	-0,076	-0,151	0,144	0,132	0,314	-0,122	-0,001	-0,180
2R	0,133	-0,096	0,036	0,007	0,155	0,022	0,063	0,118	0,001	0,078	-0,058
2U	0,089	0,059	0,310	0,188	0,258	0,245	0,421	0,011	-0,149	0,047	-0,082
2V	0,284	0,099	0,157	0,094	-0,082	0,223	0,305	0,166	0,070	0,060	-0,021
2Y	0,191	0,113	0,120	0,169	-0,128	0,300	0,187	-0,045	0,320	0,022	0,251
2F	-0,044	0,246	0,168	0,007	0,034	0,399	0,236	0,244	0,286	0,168	0,059
2M	0,239	0,328	0,283	0,476	0,146	0,339	0,447	0,044	0,131	0,043	0,126
2S	0,300	0,235	0,326	0,264	0,183	0,390	0,494	0,184	0,214	0,213	0,116
2K	0,055	0,339	0,482	0,344	0,105	0,239	0,078	0,202	0,232	0,165	0,331
2Q	0,221	0,345	0,180	0,192	0,445	0,262	0,171	0,160	0,170	0,376	0,185
2d	0,461	0,188	0,267	0,135	0,263	0,008	0,167	0,289	0,143	0,347	0,161
2H		0,574	0,250	0,142	0,262	-0,041	0,078	0,155	0,385	0,532	0,680
2G	0,574		0,263	0,343	0,361	0,348	0,299	0,120	0,219	0,537	0,705
2L	0,250	0,263		0,437	0,188	0,249	0,320	0,387	0,352	0,282	0,272
2E	0,142	0,343	0,437		0,366	0,478	0,418	0,278	0,335	0,141	0,321
2m	0,262	0,361	0,188	0,366		0,317	0,280	0,129	0,106	0,271	0,362
2P	-0,041	0,348	0,249	0,478	0,317		0,802	0,368	0,227	0,253	0,271
2O	0,078	0,299	0,320	0,418	0,280	0,802		0,341	0,152	0,206	0,172
2C	0,155	0,120	0,387	0,278	0,129	0,368	0,341		0,391	0,313	0,228
2X	0,385	0,219	0,352	0,335	0,106	0,227	0,152	0,391		0,420	0,468
2J	0,532	0,537	0,282	0,141	0,271	0,253	0,206	0,313	0,420		0,541
2I	0,680	0,705	0,272	0,321	0,362	0,271	0,172	0,228	0,468	0,541	
2W	0,211	0,291	0,521	0,279	0,081	0,395	0,417	0,535	0,533	0,375	0,291
2f	0,469	0,345	0,392	0,305	0,303	0,257	0,291	0,358	0,582	0,351	0,610
2l	0,329	0,309	0,368	0,331	0,426	0,147	0,250	0,445	0,183	0,411	0,340
2s	0,373	0,394	0,293	0,324	0,273	0,312	0,402	0,334	0,322	0,390	0,371
2T	0,256	0,394	0,315	0,219	0,452	0,332	0,311	0,350	0,595	0,406	0,515
2g	0,363	0,366	0,236	0,530	0,456	0,593	0,482	0,368	0,302	0,481	0,446
2B	0,115	0,417	0,271	0,412	0,291	0,513	0,307	0,455	0,440	0,401	0,558
2a	0,309	0,341	0,317	0,355	0,566	0,364	0,391	0,314	0,537	0,53	0,521
2j	0,445	0,209	0,316	0,519	0,413	0,297	0,357	0,424	0,376	0,399	0,303
2b	0,308	0,515	0,197	0,240	0,386	0,298	0,283	0,376	0,392	0,468	0,546
2p	0,281	0,310	0,424	0,240	0,507	0,243	0,314	0,437	0,379	0,397	0,341
2c	0,166	0,296	0,400	0,552	0,432	0,370	0,341	0,409	0,448	0,353	0,483
2A	0,269	0,247	0,417	0,356	0,306	0,338	0,353	0,753	0,480	0,457	0,435
2N	0,502	0,439	0,331	0,555	0,390	0,381	0,442	0,437	0,416	0,396	0,485
2k	0,178	0,348	0,227	0,247	0,521	0,390	0,362	0,476	0,411	0,493	0,499
2r	0,294	0,337	0,320	0,377	0,541	0,343	0,365	0,463	0,510	0,475	0,504
2D	0,237	0,305	0,343	0,447	0,376	0,359	0,361	0,554	0,505	0,442	0,456
2o	0,406	0,308	0,303	0,233	0,540	0,286	0,286	0,436	0,605	0,427	0,526
2i	0,461	0,501	0,441	0,480	0,635	0,507	0,447	0,363	0,535	0,554	0,673
2e	0,222	0,376	0,346	0,495	0,539	0,456	0,476	0,444	0,641	0,493	0,493
2q	0,341	0,495	0,408	0,396	0,534	0,500	0,473	0,399	0,427	0,527	0,590
2h	0,530	0,466	0,426	0,404	0,572	0,534	0,597	0,437	0,476	0,592	0,578
Mittelwert	0,290	0,295	0,308	0,320	0,323	0,331	0,332	0,334	0,347	0,347	0,370

Fortsetzung Tab. 8-2:

Ver- bindung	2W	2f	2l	2s	2T	2g	2B	2a	2j	2b	2p
2n	0,055	-0,140	-0,037	0,140	-0,030	0,125	-0,083	-0,142	-0,165	-0,071	0,037
2R	0,155	-0,209	0,248	0,333	-0,054	0,097	-0,199	-0,065	0,029	-0,156	0,074
2U	-0,042	-0,347	0,117	0,300	0,059	0,342	-0,363	0,005	0,063	-0,422	0,139
2V	0,089	-0,055	0,006	0,189	0,015	0,195	-0,170	-0,063	-0,006	0,233	0,060
2Y	0,340	0,377	-0,161	0,034	0,219	-0,059	0,367	0,084	-0,054	0,002	0,022
2F	0,378	0,264	-0,060	-0,010	0,332	-0,063	0,455	0,216	-0,099	0,253	0,173
2M	0,320	0,139	0,142	0,256	0,215	0,094	0,146	0,067	0,017	0,023	0,152
2S	0,315	0,127	0,322	0,527	0,306	0,299	-0,121	0,236	0,234	0,018	0,289
2K	0,319	0,420	0,190	0,092	0,216	0,469	0,625	0,240	0,361	0,599	0,304
2Q	0,213	0,172	0,337	0,347	0,260	0,437	0,339	0,411	0,289	0,466	0,354
2d	0,295	0,100	0,720	0,680	0,190	0,311	0,036	0,203	0,614	0,142	0,403
2H	0,211	0,469	0,329	0,373	0,256	0,363	0,115	0,309	0,445	0,308	0,281
2G	0,291	0,345	0,309	0,394	0,394	0,366	0,417	0,341	0,209	0,515	0,310
2L	0,521	0,392	0,368	0,293	0,315	0,236	0,271	0,317	0,316	0,197	0,424
2E	0,279	0,305	0,331	0,324	0,219	0,530	0,412	0,355	0,519	0,240	0,240
2m	0,081	0,303	0,426	0,273	0,452	0,456	0,291	0,566	0,413	0,386	0,507
2P	0,395	0,257	0,147	0,312	0,332	0,593	0,513	0,364	0,297	0,298	0,243
2O	0,417	0,291	0,250	0,402	0,311	0,482	0,307	0,391	0,357	0,283	0,314
2C	0,535	0,358	0,445	0,334	0,350	0,368	0,455	0,314	0,424	0,376	0,437
2X	0,533	0,582	0,183	0,322	0,595	0,302	0,440	0,537	0,376	0,392	0,379
2J	0,375	0,351	0,411	0,390	0,406	0,481	0,401	0,53	0,399	0,468	0,397
2I	0,291	0,610	0,340	0,371	0,515	0,446	0,558	0,521	0,303	0,546	0,341
2W		0,543	0,432	0,441	0,427	0,239	0,536	0,305	0,315	0,395	0,426
2f	0,543		0,308	0,311	0,485	0,293	0,588	0,609	0,482	0,757	0,426
2l	0,432	0,308		0,658	0,320	0,350	0,408	0,390	0,672	0,474	0,470
2s	0,441	0,311	0,658		0,372	0,298	0,297	0,482	0,426	0,409	0,503
2T	0,427	0,485	0,320	0,372		0,285	0,477	0,599	0,246	0,500	0,738
2g	0,239	0,293	0,350	0,298	0,285		0,614	0,416	0,498	0,494	0,347
2B	0,536	0,588	0,408	0,297	0,477	0,614		0,440	0,533	0,701	0,499
2a	0,305	0,609	0,390	0,482	0,599	0,416	0,440		0,573	0,64	0,580
2j	0,315	0,482	0,672	0,426	0,246	0,498	0,533	0,573		0,708	0,435
2b	0,395	0,757	0,474	0,409	0,500	0,494	0,701	0,64	0,708		0,519
2p	0,426	0,426	0,470	0,503	0,738	0,347	0,499	0,580	0,435	0,519	
2c	0,491	0,600	0,714	0,474	0,387	0,452	0,745	0,556	0,758	0,643	0,498
2A	0,522	0,582	0,534	0,343	0,517	0,465	0,577	0,582	0,643	0,702	0,581
2N	0,370	0,418	0,566	0,544	0,416	0,517	0,547	0,517	0,664	0,544	0,506
2k	0,427	0,510	0,658	0,462	0,563	0,521	0,776	0,627	0,760	0,773	0,665
2r	0,379	0,490	0,532	0,506	0,755	0,470	0,461	0,724	0,580	0,641	0,744
2D	0,515	0,579	0,635	0,431	0,476	0,603	0,727	0,600	0,788	0,721	0,570
2o	0,457	0,666	0,485	0,455	0,710	0,461	0,535	0,769	0,620	0,710	0,734
2i	0,402	0,612	0,426	0,440	0,511	0,681	0,577	0,727	0,548	0,591	0,570
2e	0,510	0,536	0,569	0,562	0,572	0,647	0,651	0,672	0,593	0,645	0,551
2q	0,427	0,563	0,432	0,462	0,794	0,516	0,620	0,657	0,477	0,665	0,795
2h	0,471	0,590	0,550	0,594	0,537	0,713	0,661	0,630	0,614	0,717	0,605
Mittelwert	0,365	0,379	0,381	0,381	0,395	0,396	0,411	0,415	0,415	0,422	0,419

Fortsetzung Tab. 8-2:

Ver- bindung	2c	2A	2N	2k	2r	2D	2o	2i	2e	2q	2h
2n	-0,193	0,582	-0,119	-0,191	-0,128	-0,151	-0,090	-0,157	-0,199	-0,005	0,089
2R	-0,078	-0,056	-0,118	-0,079	0,060	-0,036	0,011	0,162	0,054	-0,066	0,228
2U	-0,174	-0,152	0,230	-0,149	0,025	-0,214	-0,094	0,228	0,110	0,052	0,314
2V	-0,166	-0,153	0,144	-0,181	0,005	-0,130	-0,070	0,116	-0,009	0,102	0,149
2Y	0,141	0,025	0,033	-0,041	0,005	0,038	0,156	0,160	0,098	0,236	0,052
2F	0,092	0,247	0,080	0,249	0,064	0,173	0,190	0,186	0,181	0,285	0,059
2M	0,133	-0,033	0,339	-0,032	0,073	-0,042	-0,070	0,123	0,165	0,234	0,086
2S	0,059	0,083	0,308	-0,030	0,387	0,050	0,292	0,289	0,218	0,348	0,536
2K	0,448	0,377	0,404	0,475	0,271	0,509	0,300	0,320	0,341	0,393	0,400
2Q	0,254	0,360	0,270	0,325	0,354	0,361	0,354	0,400	0,371	0,355	0,522
2d	0,310	0,279	0,414	0,314	0,382	0,292	0,359	0,280	0,334	0,282	0,542
2H	0,166	0,269	0,502	0,178	0,294	0,237	0,406	0,461	0,222	0,341	0,530
2G	0,296	0,247	0,439	0,348	0,337	0,305	0,308	0,501	0,376	0,495	0,466
2L	0,400	0,417	0,331	0,227	0,320	0,343	0,303	0,441	0,346	0,408	0,426
2E	0,552	0,356	0,555	0,247	0,377	0,447	0,233	0,480	0,495	0,396	0,404
2m	0,432	0,306	0,390	0,521	0,541	0,376	0,540	0,635	0,539	0,534	0,572
2P	0,370	0,338	0,381	0,390	0,343	0,359	0,286	0,507	0,456	0,500	0,534
2O	0,341	0,353	0,442	0,362	0,365	0,361	0,286	0,447	0,476	0,473	0,597
2C	0,409	0,753	0,437	0,476	0,463	0,554	0,436	0,363	0,444	0,399	0,437
2X	0,448	0,480	0,416	0,411	0,510	0,505	0,605	0,535	0,641	0,427	0,476
2J	0,353	0,457	0,396	0,493	0,475	0,442	0,427	0,554	0,493	0,527	0,592
2I	0,483	0,435	0,485	0,499	0,504	0,456	0,526	0,673	0,493	0,590	0,578
2W	0,491	0,522	0,370	0,427	0,379	0,515	0,457	0,402	0,510	0,427	0,471
2f	0,600	0,582	0,418	0,510	0,490	0,579	0,666	0,612	0,536	0,563	0,590
2I	0,714	0,534	0,566	0,658	0,532	0,635	0,485	0,426	0,569	0,432	0,550
2s	0,474	0,343	0,544	0,462	0,506	0,431	0,455	0,440	0,562	0,462	0,594
2T	0,387	0,517	0,416	0,563	0,755	0,476	0,710	0,511	0,572	0,794	0,537
2g	0,452	0,465	0,517	0,521	0,470	0,603	0,461	0,681	0,647	0,516	0,713
2B	0,745	0,577	0,547	0,776	0,461	0,727	0,535	0,577	0,651	0,620	0,661
2a	0,556	0,582	0,517	0,627	0,724	0,600	0,769	0,727	0,672	0,657	0,630
2j	0,758	0,643	0,664	0,760	0,580	0,788	0,620	0,548	0,593	0,477	0,614
2b	0,643	0,702	0,544	0,773	0,641	0,721	0,710	0,591	0,645	0,665	0,717
2p	0,498	0,581	0,506	0,665	0,744	0,570	0,734	0,570	0,551	0,795	0,605
2c		0,588	0,664	0,797	0,560	0,816	0,620	0,578	0,722	0,549	0,610
2A	0,588		0,550	0,639	0,670	0,715	0,753	0,519	0,546	0,616	0,646
2N	0,664	0,550		0,583	0,576	0,678	0,503	0,516	0,686	0,602	0,664
2k	0,797	0,639	0,583		0,670	0,839	0,713	0,581	0,747	0,654	0,668
2r	0,560	0,670	0,576	0,670		0,692	0,830	0,611	0,679	0,874	0,628
2D	0,816	0,715	0,678	0,839	0,692		0,688	0,612	0,833	0,631	0,738
2o	0,620	0,753	0,503	0,713	0,830	0,688		0,681	0,655	0,749	0,675
2i	0,578	0,519	0,516	0,581	0,611	0,612	0,681		0,691	0,661	0,815
2e	0,722	0,546	0,686	0,747	0,679	0,833	0,655	0,691		0,623	0,777
2q	0,549	0,616	0,602	0,654	0,874	0,631	0,749	0,661	0,623		0,688
2h	0,610	0,646	0,664	0,668	0,628	0,738	0,675	0,815	0,777	0,688	
Mittelwert	0,431	0,413	0,441	0,444	0,458	0,459	0,458	0,481	0,484	0,485	0,526

8.2 Daten der Löslichkeitsuntersuchungen

Tab. 8-3: Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen nach AAV 15 der Verbindungen **50a-c** in gesättigter wässriger Lösung.

	50a	51b	52c
Einwaage Ref. (mg)	1.048	1.016	1.005
Brutto-Retentionszeit (min)	3.5	2.3	4.1
AUC H ₂ O ($\cdot 10^6$) ^a	97.8	56.3	33.3
AUC Ref. ($\cdot 10^6$) ^b	118.7	113.4	162.1
Konzentration (mg/mL)	0.87	0.43	0.21

^a AUC (Area under curve) H₂O: Integrationseinheiten des Signals der in Wasser gelösten Probe

^b AUC Ref.: Integrationseinheiten des Signals der in DMSO gelösten Referenzprobe

8.3 Gefahrstoffverzeichnis

Über die toxikologischen Eigenschaften der meisten im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen liegen keine Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes vor. Gefährliche Eigenschaften können nicht ausgeschlossen werden. Sie sind mit der für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsicht zu handhaben.

Nachfolgende im Rahmen dieser Arbeit verwendete gefährliche Stoffe und Zubereitungen, deren Gebrauch besondere Vorsicht gebietet, sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Acetylchlorid:	<p>F Leichtentzündlich</p> <p>C Ätzend</p> <p>R 11–14–34 Leichtentzündlich – Reagiert heftig mit Wasser – Verursacht Verätzungen</p> <p>S 9–16–26–45 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten, nicht rauchen – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (Wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)</p>
Aliphatische Amine:	<p>F Leichtentzündlich</p> <p>C Ätzend</p> <p>R 11–20/21/22–35 Leichtentzündlich – Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut – Verursacht schwere Verätzungen</p> <p>S 3–16–26–29–36/37/39–45 Kühl aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten, nicht rauchen – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen –</p>

	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (Wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
Alkali- und Erdalkali-hydroxide:	<p>C Ätzend</p> <p>R 35 Verursacht schwere Verätzungen</p> <p>S 26–37/39–45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)</p>
Aluminiumchlorid (wasserfrei):	<p>C Ätzend</p> <p>R 34 Verursacht Verätzungen</p> <p>S 7/8–28–45 Behälter trocken und dicht geschlossen halten – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)</p>
Anilin:	<p>T Giftig</p> <p>N Umweltgefährlich</p> <p>R 20/21/22–40–48/23/24/25–50 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut – Verdacht auf krebserzeugende Wirkung – Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken – Sehr giftig für Wasserorganismen</p> <p>S 28–36/37–45–61 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen) – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen</p>

Bortribromid:	<p>T+ Sehr giftig</p> <p>C Ätzend</p> <p>R 14–26/28–35 Reagiert heftig mit Wasser – Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken – Verursacht schwere Verätzungen</p> <p>S 9–26–28–36/37/39–45 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen – Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)</p>
Diethylether:	<p>F+ Hochentzündlich</p> <p>Xn Gesundheitsschädlich</p> <p>R 12–19–22–66–67 Hochentzündlich – Kann explosionsfähige Peroxide bilden – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen – Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen</p> <p>S 9–16–29–33 Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen</p>
<i>N,N</i> -Dimethylformamid:	<p>T Giftig</p> <p>R 61–20/21–36 Kann das Kind im Mutterleib schädigen – Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut – Reizt die Augen</p> <p>S 53.1–45 Exposition vermeiden – Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Achtung – nur für den berufsmäßigen Verwender – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett</p>

	vorzeigen)
Formaldehyd-	T Giftig
Lösung 35%:	R 23/24/25–34–40–43 Giftig beim Einatmen, Verschlucken, und Berühren mit der Haut – Verursacht Verätzungen – Irreversibler Schaden möglich – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich S 26–36/37/39–45–51 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser nachspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsmaske tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort den Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen) – Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden
Glutardialdehyd-	T Giftig
Lösung 25%:	N Umweltgefährlich R 22–23/24–34–42/43–50 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut – Verursacht Verätzungen – Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich – Sehr giftig für Wasserorganismen S 26–36/37/39–45–61 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser nachspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsmaske tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort den Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen) – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisung einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
Hydrazin-	T Giftig
monohydrat:	N Umweltgefährlich R 45–23/24/25–34–43–50/53 Kann Krebs erzeugen – Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut –

Verursacht Verätzungen – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich – sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben
 S 53–26–36/37/39– 45–60–61 Exposition vermeiden – Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser nachspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden – Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Kaliumhydrid:

F Leichtentzündlich

C Ätzend

R 11–14/15–34 Leichtentzündlich – Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase – Verursacht Verätzungen

S 16–26–27–36/37/39–45 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen – Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Beschmutzte getränkte Kleidung sofort ausziehen – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)

Natriumazid:

T+ Sehr giftig

N Umweltgefährlich

R 28–32–50/53 Sehr giftig beim Verschlucken – Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase – Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig

schädliche Wirkungen haben

S 28–45–60–61 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden – Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Propagylalkohol: T Giftig

N Umweltgefährlich

R 10–23/24/25–34–50/53 Entzündlich – Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut – Verursacht Verätzungen – Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben

S 26–28–36–45–61–Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser nachspülen und Arzt konsultieren – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort den Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen) – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisung einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Schwefelsäure

C Ätzend

(95–98%):

R 14–35–37 Reagiert heftig mit Wasser – Verursacht schwere Verätzungen – Reizt die Atmungsorgane

S 26–30–45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Niemals Wasser hinzu gießen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)

Silbernitrat:

C Ätzend

N Umweltgefährlich

R 34–50/53 Verursacht Verätzungen – Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

S 26–45–60–61 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Tetrahydrofuran: F Leichtentzündlich

Xi Reizend

R 11–19–36/37 Leichtentzündlich – Kann explosionsfähige Peroxide bilden – Reizt die Augen und die Atmungsorgane

S 16–29–33 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen

Trichloressig-
säure:

C Ätzend

N Umweltgefährdend

R 35–50/53 Verursacht schwere Verätzungen – Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben

S 26–36/37/39–45–60–61 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (Wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisung einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

8.4 Literaturverzeichnis

1. Hino, K. und Matsumoto, J.-I.: Medicinal chemistry of 1-benzazepines. *Prog. Med. Chem.* **1990**, 27, 123-141.
2. Kunick, C.: Fused azepinones with antitumor activity. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, 5, 181-194.
3. James, D. M. und Rees, A. H.: A chemical and pharmacological study of some compounds derived from 3,4-xylydine. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, 5, 1234-1239.
4. Link, A. und Kunick, C.: Preparation of spiro[1-benzazepine-4,1'-cyclohexane] derivatives from 1*H*-1-benzazepine-2,5(3*H*, 4*H*)-diones and Mannich bases. *Synthesis* **1997**, 297-300.
5. Bleeker, C. und Kunick, C.: Naphthannelated azepinones. Synthesis and antitumor activity. *Pharmazie* **1999**, 54, 645-650.
6. Sausville, E. A., Zaharevitz, D., Gussio, R., Meijer, L., Louarn-Leost, M., Kunick, C., Schultz, R., Lahusen, T., Headlee, D., Stinson, S., Arbuck, S. G. und Senderowicz, A.: Cyclin-dependent kinases: Initial approaches to exploit a novel therapeutic target. *Pharmacol. Ther.* **1999**, 82, 285-292.
7. Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L. und Sausville, E. A.: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2566-2569.
8. Kunick, C. und Link, A.: Synthesis of pyrido[3,2-*d*][1]benzazepines. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, 32, 803-805.
9. Link, A. und Kunick, C.: *d*-Fused [1]benzazepines with selective in vitro antitumor activity: synthesis and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1299-1305.
10. Link, A., Zaharevitz, D. W. und Kunick, C.: Antitumor pyrido[3,2-*d*][1]benzazepines: Synthesis and in vitro activity of thiophene analogs. *Pharmazie* **1999**, 54, 163-166.
11. Schultz, C., Link, A. und Kunick, C.: Aryl rings are part of the darpone pharmacophore. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, 334, 163-166.
12. Plowman, J., Dykes, D. J., Hollingshead, M., Simpsom-Herren, L. und Alley, M. C.: Human tumor xenograft models in NCI drug development. In: *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval*. Teiche, B. Ed.; Humana Press, Totowa (USA) **1997**, 101-125.
13. National Cancer Institute, unveröffentlichte Ergebnisse.
14. Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y.-Z., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Kunick, C. und Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5983-5994.
15. Paull, K. D., Shoemaker, R. H., Hodes, L., Monks, A., Scudiero, D. A., Rubinstein, L., Plowman, J. und Boyd, M. R.: Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines:

- Development of meangraph and COMPARE algorithm. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, 81, 1088-1092.
16. Boyd, M. R. und Paull, K. D.: Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **1995**, 34, 91-109.
 17. Weinstein, J. N., Myers, T. G., O'Connor, P. M., Friend, S. H., Fornace Jr., A. J., Kohn, K. W., Fojo, T., Bates, S. E., Rubinstein, L. V., Anderson, N. L., Buolamwini, J. K., van Osdol, W. W., Monks, A. P., Scudiero, D. A., Sausville, E. A., Zaharevitz, D. W., Bunow, B., Viswanadhan, V. N., Johnson, G. S., Wittes, R. E. und Paull, K. D.: An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* **1997**, 275, 343-349.
 18. Monks, A., Scudiero, D. A., Johnson, G. S., Paull, K. D. und Sausville, E. A.: The NCI anti-cancer drug screen: A smart screen to identify effectors of novel targets. *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, 12, 533-541.
 19. Wosikowski, K., Schuurhuis, D., Johnson, K., Paull, K. D., Myers, T. G., Weinstein, J. N. und Bates, S. E.: Identification of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 pathway inhibitors by correlation with gene expression patterns. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, 89, 1505-1515.
 20. Shoyab, M., Plowman, G. D., McDonald, V. L., Bradley, J. G. und Todaro, G. J.: Structure and function of human amphiregulin: A member of the epidermal growth factor family. *Science* **1989**, 243, 1074-1076.
 21. Perez, R., Pascual, M., Macias, A. und Lage, A.: Epidermal growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **1994**, 4, 189-193.
 22. Hendler, F. J. und Ozanne, B. W.: Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* **1984**, 74, 647-651.
 23. Knockaert, M., Wieking, K., Schmitt, S., Leost, M., Grant, K. M., Mottram, J. C., Kunick, C. und Meijer, L.: Intracellular targets of paullones: Identification following affinity purification on immobilized inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25493-25501.
 24. Boyd, M. R., Paull, K. D. und Rubinstein, L. R.: *Twenty-Second Annual Cancer Symposium*. **1990**, Kluwer Academic Publishers, Boston, Detroit, Michigan, 11-34.
 25. Paull, K. D., Hamel, E., Malspeis, L. und Foye, W. O.: Prediction of biochemical mechanism of action from the in vitro antitumor screen of the National Cancer Institute. In: Foye, W.O., *Cancer Chemotherapeutic Agents, American Chemical Society Books, Washington, D.C.* **1995**, 9-45.
 26. Kunick, C., Bleeker, C., Prühs, C., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G. und Link, A.: Matrix compare analysis discriminates subtle structural differences in a family of novel antiproliferative agents, diaryl-3-hydroxy-2,3,3a,10a-tetrahydrobenzo[b]cyclopenta[e]azepine-4,10(1H,5H)-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2148-2153.
 27. Kunick, C.: Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxycarbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, 324, 579-581.

28. Kunick, C., Schultz, C., Lemcke, T., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Jalluri, R. K., Sausville, E. A., Leost, M. und Meijer, L.: 2-Substituted paullones: CDK1/cyclin B-inhibiting property and in vitro antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 567-569.
29. Xie, X. und Kunick, C.: unveröffentlichte Ergebnisse.
30. Chen, W.-Y. und Gilman, N. W.: Synthesis of 7-phenylpyrimido[5,4-d][1]benzazepin-2-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 663-666.
31. Wieking, K., Knockaert, M., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Meijer, L. und Kunick, C.: Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 335, 311-317.
32. Tomita, M., Minami, S. und Ueyo, S.: The Schmidt reaction with benzocycloalkenones. *J. Chem. Soc. C* **1969**, 183-188.
33. Wieking, K.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Paullonen. *Dissertation Universität Hamburg* **2001**.
34. Sawa, Y., Kato, T., Masuda, T., Hori, M. und Fujimura, H.: Studies on the synthesis of analgesics. IV. Synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzazepine derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, 23, 1917-1927.
35. Johnson, G. P. und Marples, B. A.: Photochemistry of 2'-substituted 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-1-spiro-3'-oxaziridines. Variable-temperature ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of 1-substituted 1,3,4,5-tetrahydro-2H-1-benzazepin-2-ones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1988**, 3399-3406.
36. Hassner, A., Amit, B., Marks, V. und Gottlieb, H. E.: Dynamic and static conformational analysis of acylated tetrahydrobenzazepines. *J. Org. Chem.* **2003**, 6853-6858.
37. Bhusare, S. R., Jarikote, D. V., Deshmukh, R. R., Jadhav, W. N., Pawar, R. P. und Vibhute, Y. B.: A facile synthesis of 1,3,4,6-tetrahydro-1,6-benzodiazocine-2,5-diones. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, 24, 1377-1378.
38. Jarikote, D. V., Pawar, V. G., Bhusare, S. R., Hangarge, R. V., Vibhute, Y. B. und Pawar, R. P.: A facile synthesis of 1,3,4,6-tetrahydro-1,6-benzodiazocine-2,5-diones. *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, 40, 575-577.
39. Trujillo-Ferrara, J., Montoya Cano, L. und M., E.-F.: Synthesis, anticholinesterase activity and structure-activity relationships of m-aminobenzoic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1825-1827.
40. Eaton, P. E., Carlson, G. R. und Lee, J. T.: Phosphorus pentoxide-methanesulfonic acid. A convenient alternative to polyphosphoric acid. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 4071-4073.
41. Brundish, D., Bull, A., Donovan, V., Fullerton, J. D., Garman, S. M., Hayler, J. F., Janus, D., Kane, P. D., McDonnell, M., Smith, G. P., Wakeford, R., Walker, C. V., Howarth, G., Hoyle, W., Allen, M. C., Ambler, J., Butler, K. und Talbot, M. D.: Design and synthesis of thrombin inhibitors: Analogues of MD-805 with reduced stereogenicity and improved potency. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4584-4603.

42. Van Heerden, P. S., Bezuidenhoudt, B. C. B. und Ferreira, D.: Improved synthesis for the rodenticides diphenacoum and brodifacoum. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 8, 1141-1146.
43. Noguchi, T., Onodera, A., Tomisawa, K. und Yokomori, S.: A practical procedure for the synthesis of esonarimod, (*R,S*)-2-acetylthiomethyl-4-(4-methylphenyl)-4-oxobutanoic acid, an antirheumatic agent (part 1). *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 1407-1412.
44. Wang, H., Kispert, L. D. und Sang, H.: An e.s.r. investigation of radical cations formed in Friedel–Crafts reactions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1989**, 1463-1470.
45. House, H. O., Holt, J. T. und VanDerveer, D.: Unsymmetrically substituted 2,7-dimethyl-1,8-diarylanthracenes. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7516-7523.
46. Yang, W. J., Kim, D. Y., Jeong, M.-Y., Kim, H. M., Jeon, S.-J. und Cho, B. R.: 2,6-Bis(styryl)anthracene derivatives with large two-photon cross-sections. (Daten aus: Elektronik supplementary information for Chemical Communications). *Chem. Commun.* **2003**, 2618 - 2619.
47. Watanabe, N., Kabasawa, Y., Takase, Y., Matsukura, M., Miyazaki, K., Ishihara, H., Kodama, K. und Adachi, H.: 4-Benzylamino-1-chloro-6-substituted phthalazines: synthesis and inhibitory activity toward phosphodiesterase 5. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3367-3372.
48. Bleeker, C.: [c]-Anellierte 1-Benzazepine - Synthese und antivirale Eigenschaften. *Dissertation Universität Hamburg* **1998**.
49. McOmie, J. F. W., Watts, M. L. und West, D. E.: Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron* **1968**, 24, 2289-2292.
50. Link, A.: Antitumoraktive Pyrido[3,2-*d*]-1-benzazepine. *Dissertation Universität Hamburg* **1996**.
51. Gibson, M. S. und Bradshaw, R. W.: Gabriel-Synthese primärer Amine. *Angew. Chem.* **1968**, 80, 986-996.
52. Otzen, T., Wempe, E. G., Kunz, B., Bartels, R., Lehwark-Yvetot, G., Hansel, W., Schaper, K. J. und Seydel, J. K.: Folate-synthesizing enzyme system as target for development of inhibitors and inhibitor combinations against *Candida albicans*-synthesis and biological activity of new 2,4-diaminopyrimidines and 4'-substituted 4-aminodiphenyl sulfones. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 240-253.
53. Boden, N., Bushby, R. J., Clarkson, S., Evens, S. D., Knowles, P. F. und Marsh, A.: The design and synthesis of simple molecular tethers for binding biomembranes to a gold surface. *Tetrahedron* **1997**, 53, 10393-10952.
54. Parrick, J. und Mehta, L. K.: The synthesis of a potential anti-cancer agent containing the caffeine and 1,2,4-benzotriazine moieties. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, 30, 323-327.
55. Marshall, W. S., Goodson, T., Cullinan, G. J., Swanson-Bean, D., Haisch, K. D., Rinkema, L. E. J. und Fleisch, H.: Leukotriene receptor antagonists synthesis and structure-activity relationships of alkoxyacetophenone derivatives. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 682-689.
56. Knockaert, M., Gray, N., Damiens, E., Chang, Y.-T., Grellier, P., Grant, K., Fergusson, D., Mottram, J., Soete, M., Dubremetz, J.-F., Le Roch, K.,

- Doerig, C., Schultz, P. G. und Meijer, L.: Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: Identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 411-422.
57. Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S. P., Tang, L., Jiang, T., Liang, D. C., Galons, H., Dierick, J. F., Pinna, L. A., Meggio, F., Totzke, F., Schachtele, C., Lerman, A. S., Carnero, A., Wan, Y., Gray, N. und Meijer, L.: Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, 35, 31208-31219.
 58. Gunzenhauser, S., Bila, E. und Strazewski, P.: Tetraethylene glycol-derived spacer for oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6277-6280.
 59. Janssen, R. G., Utley, J. H. P., Carre, E., Simon, E. und Schirmer, H.: Electroorganic reactions. Part 55. Quinodimethane chemistry. Part 3. Transition metal complexes as inter- and intra-molecular redox catalysts for the electrosynthesis of poly(p-xylylene) (PPX) polymers and oligomers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2001**, 9, 1573-1584.
 60. Heck, R. F. und Nolley, J. P.: Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 2320-2322.
 61. Sonogashira, K., Tohda, Y. und Hagihara, N.: A convenient synthesis of acetylenes: Catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 50, 4467-4470.
 62. Stephens, R. D. und Castro, C. E.: The substitution of aryl iodides with cuprous acetylides. A synthesis of tolanes and heterocyclics. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 3313-3315.
 63. Dibowski, H. und Schmidtchen, F. P.: Sonogashira cross-couplings using biocompatible conditions in water. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 525-528.
 64. Uozumi, Y. und Kobayashi, Y.: The Sonogashira reaction in water via an amphiphilic resin-supported palladium-phosphine complex under copper-free conditions. *Heterocycles* **2003**, 59, 71-74.
 65. Anastasia, L. und Negishi, E.: Highly satisfactory procedures for the Pd-catalyzed cross coupling of aryl electrophiles with in situ generated alkynylzinc derivatives. *Org. Lett.* **2001**, 3, 3111-3113.
 66. De Kort, M., Luijendijk, J., Marel, G. A. und Boom, J. H.: Synthesis of photoaffinity derivatives of adenophostin A. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3085-3092.
 67. Bouchain, G., Leit, S., Frechette, S., Khalil, E. A., Lavoie, R., Moradei, O., Woo, S. H., Fournel, M., Yan, P. T., Kalita, A., Trachy-Bourget, M. C., Beaulieu, C., Li, Z., Robert, M. F., MacLeod, A. R., Besterman, J. M. und Delorme, D.: Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 820-30.
 68. Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., Tschaen, D. M., Grabowski, E. J. J. und Reider, P. J.: Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalysed by TEMPO and bleach. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2564-2566.

69. Tashino, Y. und Togo, H.: TEMPO-mediated environmentally benign oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with poly[4-(diacetoxyiodo)styrene]. *Synlett* **2004**, 11, 2010-2012.
70. Dunkel, U.: unveröffentliche Ergebnisse, **2005**.
71. De Mico, A., Margarita, R., Parlanti, L., Vesovi, A. und Piancatelli, G.: A versatile and highly selective hypervalent iodine(III)/2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy-mediated oxidation of alcohols to carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6974-6977.
72. Cooper, T. G.: In: *Biochemische Arbeitsmethoden*. Neumeier, R. and Maurer, R. (Hrsg.), **1980**, de Gruyter, Berlin, 222-241.
73. Michow, B. M.: *Elektrophorese: Theorie und Praxis*. **1995**, de Gruyter, Berlin, 148-173.
74. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M.: In: *Prinzipien der Biochemie*. Tschesche, H. H. (Hrsg.), 2. Aufl., **1998**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 160-170.
75. Gobom, J., Nordhoff, E., Mirgorodskaya, E., Ekman, R. und Roepstorff, P.: Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **1999**, 34, 105-116.
76. Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. und Walker, J. E.: The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2000**, 7, 1055-1061.
77. Lee, S. und Tsai, F. T.: Molecular chaperones in protein quality control. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, 38, 259-265.
78. Machajewski, T., Lin, X., Jefferson, A. B. und Gao, Z.: AKT kinase and Hsp90 inhibitors as novel anti-cancer therapeutics. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2005**, 40, 262-276.
79. Dymock, B. W., Barri, I. X., Brough, P. A., Cansfield, J. E., Massey, A., McDonald, E., Hubbard, R. E., Surgenor, A., Roughley, S. D., Webb, P., Workman, P., Wright, L. und Drysdale, M. J.: Novel, potent small-molecule inhibitors of the molecular chaperone Hsp90 discovered through structure-based design. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4212.
80. Young, J. C., Moarefi, I. und Hartl, F. U.: Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* **2001**, 154, 267-273.
81. Chiosis, G., Rodina, A. und Moulick, K.: Emerging Hsp90 inhibitors: From discovery to clinic. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2006**, 6, 1-8.
82. Supino-Rosin, L., Yoshimura, A., Yarden, Y., Elazar, Z. und Neumann, D.: Intracellular retention and degradation of the epidermal growth factor receptor, two distinct processes mediated by benzoquinone ansamycins. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 21850-21855.
83. Mimnaugh, E. G., Chavany, C. und Neckers, L.: Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185^{c-erbB-2} receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 22796-22801.
84. Proteindatenbank der Rutgers University: <http://rcsb.edu/pdb/index.html>.
85. Münster, P. N., Marchion, D. C., Basso, A. D. und Rosen, N.: Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and

- apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res.* **2002**, 62, 3132-3137.
86. Chiosis, G.: Persönliche Mitteilung.
 87. Riddick, G. und Macara, I. G.: A systems analysis of importin- α - β mediated nuclear protein import. *J. Cell. Biol.* **2005**, 168, 1027-1038.
 88. Harel, A. und Forbes, D. J.: Importin beta: Conducting a much larger cellular symphony. *Mol. Cell* **2004**, 16, 319-330.
 89. Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. und Chait, B. T.: The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* **2000**, 148, 635-651.
 90. Marin-Hernandez, A., Rodriguez-Enriquez, S., Vital-Gonzalez, P. A., Flores-Rodriguez, F. L., Macias-Silva, M., Sosa-Garrocho, M. und Moreno-Sanchez, R.: Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* **2006**, 273, 1975-1988.
 91. Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Medizin und Naturwissenschaftler*. 14.Aufl., **1994**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 231-232.
 92. Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Medizin und Naturwissenschaftler*. 14.Aufl., **1994**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 235-241.
 93. Reiss, N., Kanety, H. und Schlessinger, J.: Five enzymes of the glycolytic pathway serve as substrates for purified epidermal-growth-factor-receptor kinase. *Biochem. J.* **1986**, 239, 691-697.
 94. Lloyd, P. G. und Hardin, C. D.: Role of microtubules in the regulation of metabolism in isolated cerebral microvessels. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **1999**, 277, 1250-1262.
 95. Meira, D. D., Marinho-Carvalho, M. M., Teixeira, C. A., Veiga, V. F., Da Poian, A. T., Holandino, C., de Freitas, M. S. und Sola-Penna, M.: Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol. Genet. Metab.* **2005**, 84, 354-362.
 96. Penso, J. und Beitner, R.: Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology. *Mol. Genet. Metab.* **2002**, 451, 227-235.
 97. Schneider, J. A., Diamond, I. und Rozengurt, E.: Glycolysis of quiescent cultures of 3T3 cells. Addition of serum, epidermal growth factor, and insulin increases the activity of phosphofructokinase in a protein synthesis-independent manner. *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 872-877.
 98. Valenti, M. T., Bertoldo, F., Dalle Carbonare, L., Azzarello, G., Zenari, S., Zanatta, M., Balducci, E., Vinante, O. und V., L. C.: The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer* **2006**, 6, 1-7.

99. Xing, C., LaPorte, J. R., Barbay, J. K. und Myers, A. G.: Identification of GAPDH as a protein target of the saframycin antiproliferative agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 5862-5866.
100. Wold, F. und Ballou, C. E.: Studies on the enzyme enolase. I. Equilibrium studies. *J. Biol. Chem.* **1957**, 227, 301-312.
101. Subramanian, A. und Miller, D. M.: Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the *c-myc* protooncogene. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 5958-5965.
102. Comin-Anduix, B., Boren, J., Martinez, S., Moro, C., Centelles, J. J., Trebukhina, R., Petushok, N., Lee, W. N., Boros, L. G. und Cascante, M.: The effect of thiamine supplementation on tumor proliferation. A metabolic control analysis study. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 4177-4182.
103. Rais, B., Comin, B., Puigjaner, J., Brandes, J. L., Creppy, E., Saboureau, D., Ennamany, R., Lee, W. N., Boros, L. G. und Cascante, M.: Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G₁ phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett.* **1999**, 456, 113-118.
104. Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W. und Pizzo, S. V.: Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 2811-2816.
105. Burwick, N. R., Wahl, M. L., Fang, J., Zhong, Z., Moser, T. L., Li, B., Capaldi, R. A., Kenan, D. J. und Pizzo, S. V.: An Inhibitor of the F₁ subunit of ATP synthase (IF₁) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 1740-1745.
106. Gledhill, J. R. und Walker, J. E.: Inhibition sites in F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **2005**, 386, 591-598.
107. Abrahams, J. P., Buchanan, S. K., Van Raaij, M. J., Fearnley, I. M., Leslie, A. G. und Walker, J. E.: The structure of bovine F₁-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9420-9424.
108. Salomon, A. R., Voehringer, D. W., Herzenberg, L. A. und Khosla, C.: Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F₀F₁-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14766-14771.
109. Palosaari, P. M., Kilponen, J. M., Sormunen, R. T., Hassinen, I. E. und Hiltunen, J. K.: Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA isomerases. Characterization of the mitochondrial isoenzyme in the rat. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 3347-3353.
110. Kilponen, J. M. und Hiltunen, J. K.: Beta-oxidation of unsaturated fatty acids in humans. Isoforms of Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. *FEBS Lett.* **1999**, 322, 299-303.
111. Davis-Smyth, T., Duncan, R. C., Zheng, T., Michelotti, G. und Levens, D.: The far upstream element-binding proteins comprise an ancient family of single-strand DNA-binding transactivators. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 31679-31687.
112. Liu, J., Kouzine, F., Nie, Z., Chung, H. J., Elisha-Feil, Z., Weber, A., Zhao, K. und Levens, D.: The FUSE/FBP/FIR/TFIIH system is a

- molecular machine programming a pulse of *c-myc* expression. *EMBO J.* **2006**, 25, 2119-2130.
113. Vindigni, A., Ochem, A., Triolo, G. und Falaschi, A.: Identification of human DNA helicase V with the far upstream element-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1061-1067.
 114. Tuteja, N., Rahman, K., Tuteja, R. und Falaschi, A.: Human DNA helicase V, a novel DNA unwinding enzyme from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2323-2329.
 115. Yogosawa, S., Makino, Y., Yoshida, T., Kishimoto, T., Muramatsu, M. und Tamura, T.: Molecular cloning of a novel 120-kDa TBP-interacting protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 229, 612-617.
 116. Aoki, T., Okada, N., Ishida, M., Yogosawa, S., Makino, Y. und Tamura, T.: TIP120B: A novel TIP120-family protein that is expressed specifically in muscle tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 261, 911-916.
 117. Makino, Y., Yogosawa, S., Kayukawa, K., Coin, F., Egly, J. M., Wang, Z., Roeder, R. G., Yamamoto, K., Muramatsu, M. und Tamura, T.: TATA-Binding protein-interacting protein 120, TIP120, stimulates three classes of eukaryotic transcription via a unique mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 7951-7960.
 118. Gizard, F., Lavalley, B., DeWitte, F., Teissier, E., Staels, B. und D.W., H.: The transcriptional regulating protein of 132 kDa (TReP-132) enhances P450scc gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 39144-39155.
 119. Gizard, F., Lavalley, B., DeWitte, F. und Hum, D. W.: A novel zinc finger protein TReP-132 interacts with CBP/p300 to regulate human CYP11A1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 33881-33892.
 120. Gizard, F., Robillard, R., Barbier, O., Quatannens, B., Faucompre, A., Revillion, F., Peyrat, J. P., Staels, B. und Hum, D. W.: TReP-132 controls cell proliferation by regulating the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{WAF1/Cip1} and p27^{Kip1}. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25, 4335-4348.
 121. Anand, M., Chakraborty, K., Marton, M. J., Hinnebusch, A. G. und Kinzy, T. G.: Functional interactions between yeast translation eukaryotic elongation factor (eEF) 1A and eEF3. *J. Bio. Chem.* **2003**, 278, 6985-6991.
 122. Sandbaken, M. G., Lupisella, J. A., DiDomenico, B. und Chakraborty, K.: Protein synthesis in yeast. Structural and functional analysis of the gene encoding elongation factor 3. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15838-15844.
 123. Dumas, R., Cornillon-Bertrand, C., Guigue-Talet, P., Genix, P., Douce, R. und Job, D.: Interactions of plant acetohydroxy acid isomeroreductase with reaction intermediate analogues: Correlation of the slow, competitive, inhibition kinetics of enzyme activity and herbicidal effects. *Biochem. J.* **1994**, 301, 813-820.
 124. Tyagi, R., Lee, Y. T., Guddat, L. W. und Duggleby, R. G.: Probing the mechanism of the bifunctional enzyme ketol-acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis of the active site. *FEBS J.* **2005**, 272, 593-602.

125. Watford, M.: Hepatic glutaminase expression: Relationship to kidney-type glutaminase and to the urea cycle. *FASEB J.* **1993**, 7, 1468-1474.
126. Shapiro, R. A., Clark, V. M. und Curthoys, N. P.: Inactivation of rat renal phosphate-dependent glutaminase with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Evidence for interaction at the glutamine binding site. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 2835-2838.
127. Lora, J., Alonso, F. J., Segura, J. A., Lobo, C., Marquez, J. und Mates, J. M.: Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumor cells. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 4298-4306.
128. Wong, F. C., Beuning, P. J., Silvers, C. und Musier-Forsyth, K.: An isolated class II aminoacyl-tRNA synthetase insertion domain is functional in amino acid editing. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 52857-52864.
129. Roth, H. J. und Fenner, H.: *Arzneistoffe. Struktur - Bioreaktivität - Wirkungsbezogene Eigenschaften*. 3. Aufl., **2000**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 57-84.
130. Constam, D. B., Tobler, A. R., Rensing-Ehl, A., Kemler, I., Hersh, L. B. und Fontana, A.: Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26931-26939.
131. Kakuta, H., Tanatani, A., Nagasawa, K. und Hashimoto, Y.: Specific nonpeptide inhibitors of puromycin-sensitive aminopeptidase with a 2,4(1*H*,3*H*)-quinazolinedione skeleton. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 1273-1282.
132. Wells, M., Brown, B. und Hall, J.: Pepsinogen C expression in intestinal IEC-6 cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2003**, 13, 301-308.
133. Szecsi, P. B., Dalgaard, D., Stakemann, G., Wagner, G. und Foltmann, B.: The concentration of pepsinogen C in human semen and the physiological activation of zymogen in the vagina. *Biol. Reprod.* **1989**, 40, 653-659.
134. Balbin, M. und Lopez-Otin, C.: Hormonal regulation of the human pepsinogen C gene in breast cancer cells. Identification of a cis-acting element mediating its induction by androgens, glucocorticoids, and progesterone. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 15175-15181.
135. Pandit, J., Danley, D. E., Schulte, G. K., Mazzalupo, S., Pauly, T. A., Hayward, C. M., Hamanaka, E. S., Thompson, J. F. und Harwood, H. J. J.: Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 30610-30617.
136. Miki, T., Kori, M., Mabuchi, H., Banno, H., Tozawa, R., Nakamura, M., Itokawa, S., Sugiyama, Y. und Yukimasa, H.: Novel 4,1-benzoxazepine derivatives with potent squalene synthase inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 401-414.
137. Hershfield, M. S., Aiyar, V. N., Premakumar, R. und Small, W. C.: S-Adenosylhomocysteine hydrolase from human placenta. Affinity purification and characterization. *Biochem. J.* **1985**, 230, 43-52.
138. Wnuk, S. F., Yuan, C. S., Borchardt, R. T., Balzarini, J., De Clercq, E. und Robins, M. J.: Anticancer and antiviral effects and inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase with 5'-carboxaldehydes and oximes

- synthesized from adenosine and sugar-modified analogues. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1608-1618.
139. Guillermin, G., Muzard, M., Glapski, C., Pilard, S. und De Clercq, E.: Inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase by 6'-cyano-5',6'-didehydro-6'-deoxyhomoadenosine and 6'-chloro-6'-cyano-5',6'-didehydro-6'-deoxyhomoadenosine. Antiviral and cytotoxic effects. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 1223-1226.
 140. Cohen, P.: The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 453-508.
 141. Janssens, V. und Goris, J.: Protein phosphatase 2A: A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **2001**, 353, 417-439.
 142. Armarego, W. L. F. und Chai, C. L. L.: *Purification of Laboratory Chemicals*. 5th Edition, **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, 6-52.
 143. Moriconi, E. J. und Maniscalco, I. A.: π -Equivalent heterocyclic congeners of tropone. Azatropones. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 208-215.
 144. Schultz, C.: Antitumoraktive [d]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. *Dissertation Universität Hamburg* **1999**.
 145. Balasubramaniyan, V. und Argade, N.: Reactions of cyclic anhydrides: Part XIII - Facile synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyridazino[6,1-b]quinazoline-2,10-diones. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1988**, 27B, 906-908.
 146. Schreiber, K. C. und Fernandez, V. P.: Lithium aluminium hydride reduction of some N-substituted succinimides. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 1744-1747.
 147. Beringer, F. M., Falk, R. A., Karniol, M., Lillien, I., Masulio, G., Mausner, M. und Sommer, E.: Diaryliodonium salts. IX. Synthesis of substituted diphenyliodonium salts. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 342-351.
 148. Kar, A. und Argade, N. P.: A simple key for benzylic mono- and gem-dibromination of primary aromatic amine derivatives using molecular bromine. *Synthesis* **2002**, 221-224.
 149. Sanna, A.: Study of the velocity of saponification of nitro- and halophenylsuccinimides with respect to molecular statics. *Gazz. Chim. Ital.* **1927**, 57, 761-771.
 150. Verma, R. K.: A facile and high yield route to succinanilic esters. *J. Indian Chem. Soc.* **1992**, 69, 683-684.
 151. Beaupere, D., Uzan, R. und Doucet, J. P.: Effect of structural modifications of aromatic carbonyl compounds on the phenol-carbonyl association measured by infrared spectroscopy. *C. R. Acad. Sc. Paris* **1974**, 278, 187-189.
 152. Nayak, A., Nayak, P. L., Sabata, B. K. und Rout, M. K.: Infrared spectra of chalcones derived from hydroxychloroacetophenones. *J. Indian Chem. Soc.* **1964**, 41, 507-512.
 153. Lyle, R. E. und Paradis, L. P.: Acid-catalyzed condensations. II. The condensation of benzaldehyde with substituted acetophenones. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 6667-6668.

154. Lebedev, A. A., Smirnov, V. A., Bazhmina, M. Y. und Karpacheva, T. A.: Synthesis and diuretic activity of phenoxyacetic acid and anisole derivatives. *Khim. Farm. Zh.* **1985**, 19, 157-159.
155. Willson, M., Perie, J. J., Malecaze, F., Oppendoes, F. und Callens, M.: Biological properties of amidinium sulfinic and sulfonic acid derivatives: Inhibition of glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei* and protective effect on cell growth. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, 27, 799-808.
156. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

Danksagung

Für die Ermöglichung und die freundliche Unterstützung der Forschungsaufenthalte an der Station Biologique de Roscoff (CNRS, Bretagne, Frankreich) im März und September 2005 danke ich Herrn Prof. Dr. L. Meijer herzlich. Den Mitarbeitern des Cell cycle laboratory, insbesondere S. Bach, Y. Ferandin, O. Lozach, J. Reinhardt, D. Guiffant danke ich für die Gastfreundschaft und die schöne Zusammenarbeit.

Für die Durchführung der Peptid-Analytik danke ich J. F. Dierick, der Firma BioVallée – Proteomics, Gosselies, Belgien.

Mein herzlicher Dank für die Molecular Modeling-Arbeiten gilt Herrn Dr. T. Lemcke und insbesondere Herrn Dr. L. Preu für die Anfertigung der Abbildungen.

Ich danke den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Institutes für Pharmazeutische Chemie für die Anfertigung der FT-IR-Spektren, die Durchführung der Elementaranalysen und die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich Herrn Prof. Dr. L. Ernst, Frau D. Deuse und Frau P. Holba-Schulz (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute). Den Herren Dr. U. Papke und Dr T. Beuerle sowie Frau D. Döring danke ich für die Aufnahme der Massenspektren. Herrn Papke gilt darüber hinaus mein Dank für die stete Hilfsbereitschaft. Für die Anfertigung der Röntgenkristallstrukturanalysen danke ich Herrn Prof. Dr. P. G. Jones.

Sehr dankbar bin ich meiner wissenschaftlichen Hilfskraft Frau S. Dudai für ihre unterstützende Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig bedanken. Für die stete Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit in Braunschweig gilt mein besonderer Dank den Mitgliedern des Arbeitskreises Frau S. Kohfeld, Frau U. Dunkel, Frau

B. Berger, Herrn H. Stukenbrock, Frau C. Reichwald, Frau A.-M. Egert, Frau A. Becker, Frau W. Brandt sowie Herrn P. Hasemann und Frau S. Schröder. Darüber hinaus möchte ich den ehemaligen Kollegen Herrn C. Enge, Herrn M. Bode, Herrn B. Gabriel, Herrn J. Ohnesorge, Herrn J. Schneider und Frau S. Huth-Wilmes für die freundliche Aufnahme am Institut bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie der Universität Hamburg bedanken. Insbesondere den ehemaligen KollegenInnen Frau T. Pies, Frau J. Roever, Herrn U. Kaula, Frau A. Klack und Frau K. Wehner danke ich für die zahlreichen wissenschaftlichen Gespräche und die vielen netten Stunden.

Lebenslauf

Name:	Christian Prühs
Geburtsdatum:	08.05.1976
Geburtsort:	Hamburg
Aug. 1982 – Jun. 1986	Grundschule Ludwig-Frahm, Hamburg
Aug. 1986 – Jun. 1995	Gymnasium Harksheider Strasse, Hamburg
Jul. 1995 – Jun. 1996	Grundwehrdienst als Sanitäter, Ordonnanz im Offiziersheim, Röttiger-Kaserne, Hamburg-Fischbek
Okt. 1996 – Sep. 1997	Studium der Verfahrenstechnik, TU Hamburg-Harburg
Okt. 1997 – Sep. 2001	Studium der Pharmazie, Universität Hamburg
Nov. 2001 – Apr. 2002	Pharmaziepraktikum, Neue Barmbeker Apotheke, Hamburg
Mai 2002 – Okt. 2002	Pharmaziepraktikum, Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg
28. Jan. 2003	Approbation als Apotheker
Nov. 2002 – Okt. 2006	Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. C. Kunick
Nov. 2002 – Dez. 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie, Universität Hamburg
Jan. 2004 – Okt. 2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

